

Aus der Medizinischen Tierklinik  
Lehrstuhl für Spezielle Pathologie und Therapie  
und für Gerichtliche Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Wilfried Kraft

**ALKALISCHE PHOSPHATASE, GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE,  
GLUTAMAT-DEHYDROGENASE UND BILIRUBIN BEI LITHOCHOLAT-  
INDUZIERTER CHOLESTASE DES HUNDES**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
HUBERT WINZINGER  
aus  
München

München 1982



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Aus der Medizinischen Tierklinik  
Lehrstuhl für Spezielle Pathologie und Therapie  
und für Gerichtliche Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Wilfried Kraft

**ALKALISCHE PHOSPHATASE, GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE,  
GLUTAMAT-DEHYDROGENASE UND BILIRUBIN BEI LITHOCHOLAT-  
INDUZIERTER CHOLESTASE DES HUNDES**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
HUBERT WINZINGER  
aus  
München

München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

|              |                      |
|--------------|----------------------|
| Dekan:       | Prof. Dr. G. Terplan |
| Referent:    | Prof. Dr. W. Kraft   |
| Korreferent: | Prof. Dr. J. Gropp   |

Tag der Promotion: 26. Februar 1982

## Meinen Eltern





# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

|        |                                                                    |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------|----|
| I.     | Einleitung                                                         | 1  |
| II.    | Literatur                                                          | 3  |
| 1.     | Physiologie der Galle                                              | 4  |
| 1.1.   | Gallebildung und Sekretion                                         | 4  |
| 1.1.1. | Der gallensäureabhängige Gallefluß                                 | 5  |
| 1.1.2. | Der gallensäureunabhängige Gallefluß                               | 6  |
| 1.2.   | Der Enterohepatische Kreislauf                                     | 7  |
| 2.     | Definition der Cholestase                                          | 8  |
| 2.1.   | Einteilung der Cholestase                                          | 8  |
| 2.2.   | Entstehung und Konsequenzen der intrahepatischen Cholestase        | 9  |
| 2.2.1. | Molekularer oder organeller Kreislauf                              | 11 |
| 2.2.2. | Hydromechanischer oder duktilär-lobulärer Kreislauf                | 13 |
| 2.3.   | Lithocholsäure-Cholestase                                          | 14 |
| 2.3.1. | Bisherige Untersuchungen zur Lithocholsäure-induzierten Cholestase | 15 |
| 3.     | Therapie einer Cholestase                                          | 19 |
| 3.1.   | Choleretica (Allgemeines)                                          | 19 |
| 3.2.   | Verwendung des Cholereticums Clanobutin                            | 20 |
| 4.     | Diagnostik                                                         | 21 |
| 4.1.   | Enzyme allgemein                                                   | 21 |
| 4.2.   | Enzyme speziell                                                    | 24 |
| 4.2.1. | Die Alkalische Phosphatase                                         | 24 |
| 4.2.2. | Die Gamma-Glutamyl-Transferase                                     | 31 |
| 4.2.3. | Die Glutamat-Dehydrogenase                                         | 39 |
| 4.3.   | Bilirubin                                                          | 45 |

|          |                                                                           |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| III.     | Eigene Untersuchungen                                                     | 53 |
| 1.       | Material und Methoden                                                     | 53 |
| 1.1.     | Tiermaterial                                                              | 53 |
| 1.1.1.   | Haltung und Fütterung                                                     | 53 |
| 1.1.2.   | Blutentnahme                                                              | 54 |
| 1.1.3.   | Medikation                                                                | 54 |
| 1.2.     | Versuchsaufbau                                                            | 55 |
| 1.2.1.   | Vorversuche bis zu ersten cholestatischen Reaktionen                      | 55 |
| 1.2.2.   | Versuche mit 160 mg LC/kg KG                                              | 55 |
| 1.2.3.   | Versuche mit weiteren Dosissteigerungen                                   | 56 |
| 1.2.4.   | Therapieversuch                                                           | 57 |
| 1.3.     | Reagenzien und Pharmaka                                                   | 57 |
| 1.4.     | Enzymbestimmungen                                                         | 58 |
| 1.4.1.   | Geräte                                                                    | 58 |
| 1.4.2.   | Probenmaterial                                                            | 58 |
| 1.4.2.1. | Serumverdünnungen                                                         | 58 |
| 1.4.2.2. | Qualitätskontrollen                                                       | 58 |
| 1.4.3.   | Alkalische Phosphatase                                                    | 59 |
| 1.4.4.   | Gamma-Glutamyl-Transferase                                                | 60 |
| 1.4.5.   | Glutamat-Dehydrogenase                                                    | 60 |
| 1.5.     | Substratbestimmung: Gesamtbilirubin                                       | 62 |
| 1.5.1.   | Geräte                                                                    | 62 |
| 1.5.2.   | Probenmaterial                                                            | 62 |
| 1.5.2.1. | Qualitätskontrolle                                                        | 62 |
| 1.5.3.   | Methodik der Bilirubinbestimmung                                          | 62 |
| IV.      | Ergebnisse                                                                | 64 |
| 1.       | Ermittlung einer cholestatisch-wirksamen Lithocholsäuredosis für den Hund | 64 |
| 1.1.     | Dosierungen ohne cholestatischen Effekt                                   | 64 |
| 1.2.     | Erste Reaktionen bei 160 mg LC/kg KG                                      | 69 |
| 1.2.1.   | Überprüfung des Vorversuchs mit 160 mg LC/kg KG                           | 69 |

|          |                                                                                    |     |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1.2.1.1. | Verlaufskontrolle nach Absetzen der LC auf cholestatischem Niveau                  | 69  |
| 1.2.1.2. | Verlaufskontrolle unter Dauerapplikation von LC                                    | 71  |
| 1.3.     | Erweiterung des Versuchsprogramms bei 160 mg LC/kg KG                              | 72  |
| 1.4.     | Weitere Dosissteigerungen                                                          | 73  |
| 1.4.1.   | 240 mg LC/kg KG                                                                    | 73  |
| 1.4.2.   | 400 mg LC/kg KG                                                                    | 78  |
| 1.4.3.   | Enddosis 1000 mg LC/kg KG                                                          | 83  |
| 2.       | Applikation des Cholereticums Clanobutin                                           | 93  |
| V.       | Diskussion                                                                         | 103 |
| 1.       | Die Lithocholat-Cholestase als Modell einer intrahepatischen Cholestase            | 103 |
| 2.       | Versuche zur experimentellen Induktion einer intrahepatischen Cholestase beim Hund | 104 |
| 3.       | Versuche zur Therapie der experimentell induzierten Cholestase beim Hund           | 109 |
| 4.       | Beurteilung der einzelnen Parameter als Indikatoren der Cholestase                 | 111 |
| VI.      | Zusammenfassung                                                                    | 115 |
|          | Summary                                                                            | 117 |
| VII.     | Literaturverzeichnis                                                               | 119 |



## I. Einleitung

Schon HIPPOKRATES legte seinem ganzen medizinischen Denken die Theorie vom Gleichgewicht der Körpersäfte zugrunde, wobei die Dyskrasie der gelben oder der schwarzen Galle der Grund für die meisten menschlichen Erkrankungen war.

PARACELSUS widersprach dieser Idee im 16. Jahrhundert und nannte die Galle "eine nutzlose und bedeutungslose Ausscheidung". 1648 beschrieb VAN HELMONT die Galle als "den höchsten Balsam des Lebens, ein edler Saft, der keine Krankheiten verursachen kann". Eine "Wiedervereinigung" dieser verschiedenen Ansichten begann im 19. Jahrhundert mit der Erkenntnis, daß die Galle eine heterogene Flüssigkeit sei. Die Identifikation der verschiedenen Bestandteile war der Anstoß für pharmakologische Nachforschungen, in deren Verlauf es deutlich wurde, daß die Galle sowohl nützliche als auch schädigende Effekte besitzt. Es kristallisierte sich heraus, daß für Schädigungen in erster Linie die Gallensalze verantwortlich sind.

Großen Anteil an der Erforschung dieses komplexen Themas hat HOLSTI (1), der als erster herausfand, daß die Gabe von getrockneter Schweinegalle an Kaninchen eine Leberzirrhose verursacht. Nach und nach bewies er, daß solche Veränderungen von gewissen gereinigten Gallensäuren induziert werden können (Lithocholsäure, Glycolithocholsäure, Taurolithocholsäure, Chenodeoxycholsäure), jedoch nicht von anderen Gallensäuren, wie z.B. Chol-, Dehydrochol- oder Deoxycholsäure (23). Seitdem rückte die Lithocholsäure zur Erzeugung einer intrahepatischen Cholestase ins Zentrum des Interesses. Als Modell soll sie dazu dienen, einen Beitrag zur Lösung der Problematik bei Diagnose und Therapie von Lebererkrankungen zu leisten, die trotz zunehmender Kenntnisse über biochemische, pharmakologische, pathologische und molekularbiologische Prozesse nach wie vor besteht.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Dosisabhängigkeit und Übertragbarkeit der für verschiedene Labor-

nager beschriebenen Ergebnisse bei Lithocholsäure-induzierter Cholestase auf den Hund zu überprüfen.

Untersucht werden sollte der Einfluß auf die Enzyme: Alkalische Phosphatase (AP), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Glutamamat-Dehydrogenase (GLDH) und das Bilirubin im Serum.

Des weiteren sollte geprüft werden, ob eine durch Lithocholsäure experimentell erzeugte Cholestase mithilfe des als Cholereticum weit verbreiteten Clofibrats wirksam behandelt und damit die toxische Anreicherung der Gallensäuren in den Hepatozyten aufgehoben werden kann. Die vorliegende Untersuchung stellt einen Teil des Forschungsprogramms dar, das an der Medizinischen Tierklinik in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der Universität München durchgeführt wird.

## II. Literatur

Mit ca. 2,5 bis 3,4 % des Körpergewichtes stellt die Leber die größte Drüse des Körpers dar. Aufgrund ihrer großen Dekompensations- und Regenerationsfähigkeit ist die Leber noch mit ca. 20 % intaktem Parenchym funktionsfähig (4). Histologisch besteht sie zu etwa 60 % aus Parenchymzellen (79,8 Vol %), 35 % Kupffer-Zellen und anderen Blutgefäßzellen (zusammen 16,6 Vol %) sowie zu je 2 % aus Gallengangszellen und Bindegewebe (zusammen 3,6 Vol %) (5).

1 cm<sup>3</sup> Leber enthält 2 mGänge und Ductuli, wobei die Oberfläche im canaliculären System auf 70 cm<sup>2</sup>/g Leber geschätzt wird. Diese wird jedoch durch die Projektion unzähliger Mikrovilli in das canaliculäre Lumen noch um ein Vielfaches vergrößert (6). Das Lebergangssystem stellt nicht nur simple Verbindungen zwischen dem Canaliculus und dem Duodenum dar, sondern agiert selbst, indem es die canaliculäre Galle durch Sekretion und Absorption verändert (7). Isolierte canine Gallengänge sezernieren eine klare, alkalische Flüssigkeit und reagieren auf gewisse gastrointestinale Hormone wie Sekretin, Cholezystokinin und Gastrin II mit Steigerung des Flusses und der Bikarbonatkonzentration (6).

WHEELER (8) und FORKER (9) bewiesen beim Hund die duktiläre Reabsorption von Flüssigkeit, die nach Clearance-Messungen (Erythritol) durchschnittlich 63 % der canaliculär gebildeten Galle betrug. Die Durchflußraten der Leber, ermittelt an nicht anaesthesierten Hunden, ergaben einen Blutfluß von  $48,6 \pm 9,9$  cm<sup>3</sup>/kg/min und einen Plasmafluß von  $26,5 \pm 4,1$  cm<sup>3</sup>/kg/min (7). Daraus resultiert eine canaliculäre Galleproduktion von 0,3 bis 0,7 µl/min/g Leber, wobei die Gallebildung von der Leberdurchblutung weitgehend unabhängig ist (10, 11). Die Tagesproduktion an Galle eines erwachsenen Menschen beträgt ca. 500 ml (12).

## 1. Physiologie der Galle

Galle als "digestive Sekretion" der Leber ist eine wäßrige Lösung (95 % Wasser) von Gallensäuren, Cholesterin und Phospholipiden zusammen mit den anorganischen Elektrolyten des Plasmas. Natrium stellt hierbei die mengenmäßig bedeutendste Komponente dar. Die Gallensäuren sind aufgrund ihrer amphoteren Eigenschaften Lösungsvermittler für sonst hydrophobe Stoffe wie Cholesterin, Phospholipide und Fettsäuren, indem sie mit diesen Micellen bilden und sie so für die intestinalen Mucosazellen resorptionsfähig machen. Daraus entwickelt sich für die Gallensäuren ein enterohepatischer Kreislauf.

Als exkretorischer Transportmechanismus ist die Galle der Ausscheidungsweg einer Vielzahl von Wirkstoffen und Metaboliten. Für die Gallenpigmente und mehrere anionische Farbstoffe existiert praktisch keine andere exkretorische Route. Das Gallenpigment Bilirubin bewirkt letztlich auch die typische Farbe der Galle (9).

### 1.1. Gallebildung und Sekretion

Die in der Leberzelle gebildete Galle wird über die canaliculäre Membran in den Canaliculus sezerniert. Dieser Sekretionsmechanismus ist noch nicht bis ins letzte Detail geklärt. Eine bisher unüberwindliche Schwierigkeit ist vor allem die Tatsache, daß die an der canaliculären Membran gebildete Galle noch nicht gewonnen werden kann. Erst die aus dem Gallengang zu gewinnende Galle ist der Analyse zugänglich.

Der canaliculäre Gallefluß jedoch läßt sich über die Bestimmung der Plasmaclearance metabolisch inerter Substanzen, wie z.B. Erythritol, messen (13, 9). Für Mensch, Ratte und Hund ergaben sich jeweils lineare Beziehungen zwischen dem Gallefluß und dieser Plasmaclearance (6,8,9).

Bei der Sekretion der Galle muß zwischen einem gallensäureabhängigen (GSAGF) und einem gallensäureunabhängigen (GSUGF) Gallefluß unterschieden werden:

### 1.1.1. Der gallensäureabhängige Gallefluß (GSAGF)

Im Unterschied zur Niere, wo das Glomerulumfiltrat allein durch den hydrostatischen Druck des arteriellen Blutes in die Tubuli abgepreßt wird, sind in der Leber aktive Transportmechanismen tätig. Dies ergab sich schon aus früheren Beobachtungen, die zeigten, daß der maximale Druck der Gallensekretion den Perfusionsdruck der isolierten Leber um 4 - 9 cm H<sub>2</sub>O übersteigt (6). Die Triebkraft für die Gallebildung an der Canaliculimembran ist die aktive Sekretion von Substanzen, auch gegen ein sehr viel höheres Konzentrationsgefälle (14). Dieser aufgebaute osmotische Gradient führt dann sekundär als passive Konsequenz des aktiven Transports zum Wassereinstrom in die Gallencanaliculi. Die Gallensäuresekretion und damit der Gallefluß sind von verschiedenen Faktoren abhängig:

- 1) der Menge an Gallensäuren, die der Leberzelle über das Sinusoidalblut zugeführt werden;
- 2) der Kinetik, der durch die Zelle in die Galle zu sezernierenden Substanzen;
- 3) der Gesamtmenge an Wasser, die den ausgeschiedenen Gallensäuren in den Canaliculus osmotisch folgt.

Zu 1): Die Plasma-Clearance für Gallensäuren ist sehr effektiv und kommt fast dem hepatischen Plasmafluß gleich. Das bedeutet, daß eine Leberpassage ausreicht, um nahezu alle anflutenden Gallensäuren in den Hepatozyten aufzunehmen (15, 16). Das Konzentrationsverhältnis canaliculäre Galle zu Plasma entspricht beim Hund nach Einbeziehung mehrerer Korrekturfaktoren etwa 50 : 1 (9).

Zu 2): Der Transport durch die Zelle beginnt mit der Stoffaufnahme an der sinusoidalen Membran über einen Carriermechanismus. Der intrazelluläre Transport der Gallensäuren findet über zwei im Cytosol nachgewiesene, gallensäurebindende Proteine, Ligandin und Protein Z statt. Die aktive, carriergesteuerte Aufnahme überragt die Exkretionskapazität um etwa das 6-fache, so daß bei der Gallebildung die Gallensäuresekretion der limitierende Faktor ist (6, 17, 18, 19).

Zu 3): Zwischen der im Canaliculus auftretenden Wassermenge und der sie induzierenden Gallensäuresekretion besteht bei fast allen bisher untersuchten Spezies eine annähernd lineare Beziehung. Sie beträgt durchschnittlich 7 - 12  $\mu\text{l H}_2\text{O}$  pro  $\mu\text{mol}$  sezernierter Gallensäure (20). Für den Hund wurde ein Wert von 8  $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$  ermittelt (6). Der gallensäureabhängige Fluß ist auch Voraussetzung für die Ausscheidung anderer organischer Anionen einschließlich des Bilirubins (21).

#### 1.1.2. Der gallensäureunabhängige Gallefluß (GSUGF)

Aus der Feststellung, daß der Gesamtgallefluß den gallensäureabhängigen Gallefluß übersteigt und auch bei fehlender Gallensäuresekretion ein bestimmter Gallefluß erhalten bleibt, ergibt sich dieser verbleibende Anteil als gallensäureunabhängiger Gallefluß. Der gallensäureunabhängige Gallefluß bedingt auch die Unterschiede im Gallevolumen pro Leber- bzw. Körpergewicht. Bei kleinen Tieren wie der Ratte ist es 10- bis 20fach höher als etwa bei Mensch oder Hund (22). Für alle untersuchten Spezies beträgt dieser GSUGF zwischen 40 und 70 % der spontanen canaliculären Galleproduktion (23).

Die untersuchenden Autoren vermuten, daß der GSUGF an den aktiven  $\text{Na}^+$ -Transport durch die membranständige  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase gebunden sein könnte. Diese Annahme basiert auf der Beobachtung, daß die Gabe von Hemmstoffen der  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -ATPase wie Ouabain, Ethacrynsäure oder Amilorid den GSUGF vermindert oder unterdrückt (24).

Weitere Untersuchungen ergaben jedoch widersprüchliche Ergebnisse, so daß noch keine endgültigen Aussagen über die Bedeutung dieses Enzyms beim GSUGF gemacht werden können (9).

Auch wird eine wechselseitige Beeinflussung zwischen GSAGF und GSUGF postuliert. Die Anwesenheit von Gallesalzen an der canaliculären Membran oder ihr Transport durch die Membran soll die Ionenpumpe, die den GSUGF bewirkt, stimulieren (6).

## 1.2. Der Enterohepatische Kreislauf

Bei Tieren mit Gallenblase bilden die Gallensalze einen Pool von konzentrierten Detergentien, die sich während der Verdauung in den oberen Teil des Dünndarms entleeren. Sie werden im Ileum fast gänzlich aktiv reabsorbiert (95 - 97 %), um über das Portalblut und die Leberzelle zur Gallenblase zurückzukehren. So muß lediglich der zwischen 3 und 5 % betragende Verlust an Gallensäuren via Faeces durch Neusynthese in den Hepatozyten ersetzt werden.

Dieser Gallensalz-Pool zirkuliert beim Menschen zwei- bis dreimal während der Verdauung jeder fetthaltigen Mahlzeit (16). Da die Halbwertszeit wenigstens zwei Tage beträgt, zeigt dies, daß der größte Teil der Gallensalze im enterohepatischen Kreislauf aus früherer Synthese stammt.

In der Galle repräsentieren sie ein Muster von primären, aus Cholesterin synthetisierten und sekundären Gallensalzen, die aus den primären durch intestinale bakteriell-enzymatische Modifikation entstehen.

Die in den Hepatozyten gebildeten, sogenannten primären Gallensalze bestehen aus Cholsäure und Chenodeoxycholsäure und stellen beim Menschen etwa 80 % der Gallensalze dar. Sie werden vor der Sekretion im Verhältnis von etwa 3 : 1 mit Glycin bzw. Taurin konjugiert (25). Bei der Ratte dient Taurin als vorherrschender Konjugationspartner, beim Hund werden ausschließlich Taurinkonjugate angetroffen (6, 26). Diese Konjugation bringt außer einer Zunahme der Polarität und Verlängerung der Seitenkette durch die Peptidbindung auch eine wesentliche Steigerung der Löslichkeit der Gallensäuren in sauren Medien. In Anbetracht der Acidität des oberen Dünndarminhaltes spielt dies eine wesentliche Rolle (mögliche Präzipitation). Im Darmlumen unterliegen die Gallensäuren weiteren bakteriell bedingten chemischen Umwandlungen. Eine 7- $\alpha$ -Dehydroxylierung führt zu den sogenannten sekundären Gallensäuren Deoxycholsäure und Lithocholsäure.

Die dekonjugierenden Enzyme der Intestinalbakterien produzieren im Darmlumen "freie" oder unkonjugierte Gallensäuren.

## 2. Definition der Cholestase

Nach POPPER (27) bedeutet "Cholestase" für den Kliniker Ikterus, verbunden mit Verminderung oder Fehlen des Galleflusses. Der Morphologe fordert sichtbare Beweise stagnierter oder inspissierter Galle in Form von Gallethromben in den Canaliculi sowie Galle in Kupffer'schen Sternzellen und Hepatozyten. Für den Radiologen wird die Cholestase als darstellbarer Gallengangsverschluß sichtbar, und für den Physiologen beinhaltet sie die Hemmung der hepatozellulären Sekretion von Galle.

### 2.1. Einteilung der Cholestase

Die Cholestase läßt sich je nach Ursache in eine extrahepatische und eine intrahepatische Form unterteilen (27, 28). Die extrahepatische Cholestase hat ein rein mechanisches Äquivalent als Grundlage. Ein Hindernis, sei es ein Tumor, ein Calculus oder eine inflammatorische Striktur, verlegen das Lumen des extrahepatischen Gallenganges zwischen der Leber und seiner Mündung in das Duodenum und führen zur Dilatation der proximal davon gelegenen biliären Passagen.

Die intrahepatische Cholestase ist meist durch chemische Mechanismen bedingt, die nicht durch eine einfache Abflußbehinderung, sondern durch Störung der biliären Sekretion der Leberzelle charakterisiert sind. Diese Alteration des Sekretionsvorganges betrifft alle gallepflichtigen Bestandteile (27, 28).

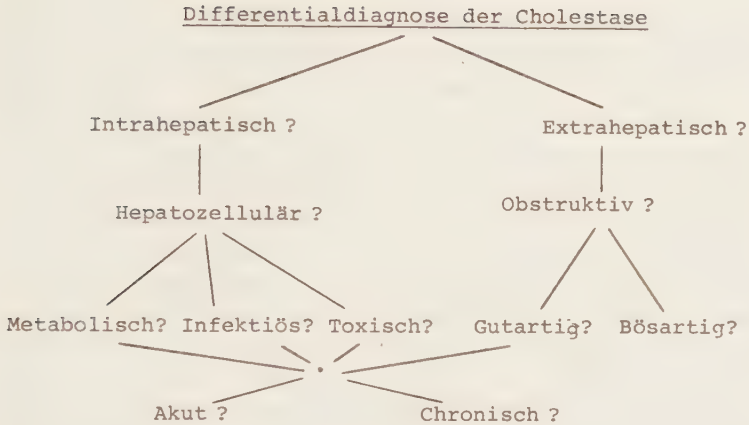


Abb. 1: Differentialdiagnose der Cholestase

Ausgehend von der Humanmedizin wird der komplexen Problematik dieses Geschehens besonderes Interesse zuteil, da verschiedene Hepatopathien mit dem Auftreten einer intrahepatischen Cholestase einhergehen.

Die wichtigsten intrahepatischen Cholestasen in der Humanmedizin (29):

1. cholestatischer Typ der Virushepatitis,
2. intrahepatische Cholestase durch Arzneimittel,
3. rezidivierende intrahepatische Schwangerschaftscholestase,
4. Fettleber mit Cholestase,
5. benigne postoperative intrahepatische Cholestase,
6. intermittierende intrahepatische Cholestase.

## 2.2. Entstehung und Konsequenzen der intrahepatischen Cholestase

Beim Studium der Literatur trifft man auf eine Fülle von Hypothesen, die zum Teil bestätigt, zum Teil widerrufen wurden. Alle Überlegungen, sowohl bezüglich des Mechanismus, als auch der Konsequenzen können am besten vereinigt werden, wenn man die intrahepatische Cholestase als Ergebnis eines multifakto-

riellen Prozesses mit verschiedenen initialen Zielpunkten betrachtet. In jedem Fall entstehen zwei circuli vitiosi. Der eine besteht auf "molekularer oder Organellenbasis" innerhalb des Hepatozyten, der andere, etwas offensichtlicher auf "hydromechanischer oder ductulärer und lobulärer Ebene" (30, 31). Diese beiden sich gegenseitig verstärkenden Kreisläufe werden durch die Retention von Gallensalzen und Bilirubin vereinigt. Sowohl der GSAGF, als auch der GSUGF nehmen ab, ob nun an der canaliculären Membran, am Cytoskelett, am endoplasmatischen Reticulum oder an den Mitochondrien initiiert. Auf lobulärer Ebene interagieren hepatozelluläre und ductuläre Läsionen (32).

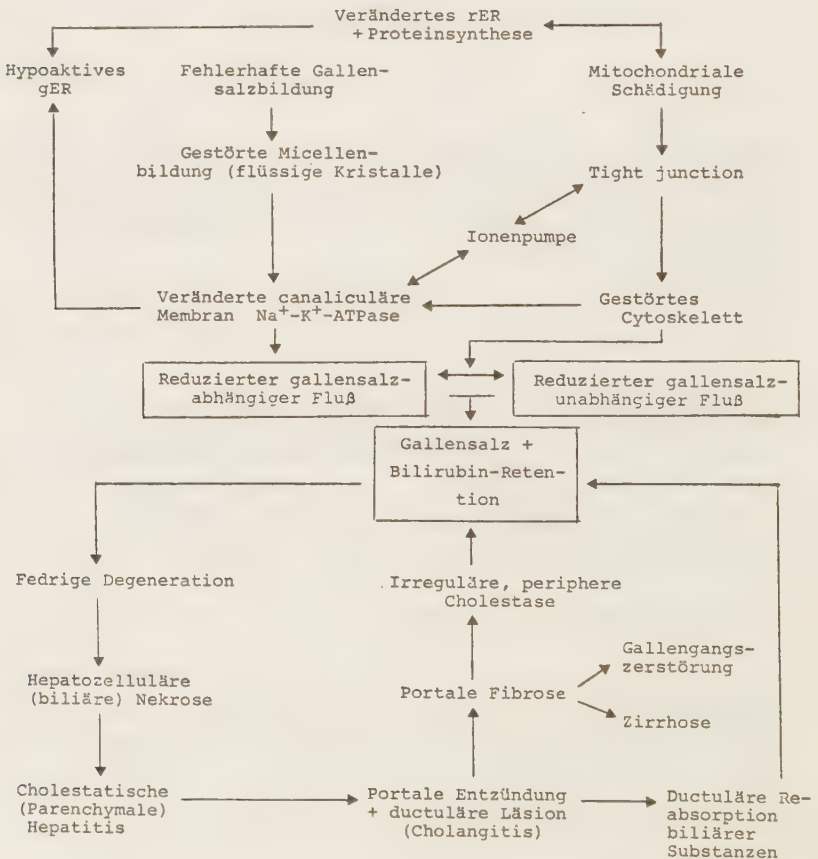


Abb. 2: Überblick über Entstehung und Konsequenzen der intrahepatischen Cholestase - zwei sich vereinigende Kreisläufe (32).

Im folgenden sollen nun einige der "steps" in den jeweiligen circuli vitiosi herausgenommen und näher besprochen werden (s. Abb.2).

### 2.2.1. Molekularer oder Organellenkreislauf

#### 1.) Hypoaktives, hypertrophisches glattes endoplasmatisches Reticulum

Bei morphologischen Analysen cholestatischer Rattenlebern (Gallengangsligatur) fand man eine Zunahme des glatten endoplasmatischen Reticulums (gER), wobei die Oberflächendichte zugenommen, das Volumen sich jedoch nicht geändert hatte, was auf eine Neubildung nicht-enzymatisch aktiver Membranen hindeutet (33, 34, 35). Nachdem das glatte ER der Sitz des mikrosomalen Biotransformationssystems ist, in dem die Synthese der Gallensäuren stattfindet, könnte eine gestörte Funktion (Hemmung der Steroidringhydroxilierung) zur vermehrten Synthese von Monohydroxy-Gallensäuren (Lithocholsäure) führen, wie es bei einigen Formen der Cholestase gefunden wurde.

Diese Monohydroxy-Gallensäuren sind schlechte Micellenbildner; Micellenbildung ist aber essentiell für den biliären Transport (33).

Spätere Studien weisen darauf hin, daß die Reaktion des gER eher eine Folge als eine Ursache der Cholestase ist, obwohl die gestörte Gallensäuresekretion nach wie vor eine Schlüsselstellung einnimmt (27, 32).

#### 2.) Flüssige Kristalle

Bei niedrigen Konzentrationen und bei Körpertemperatur sind die Gallensalze monomolekular. Bei höheren Konzentrationen wie in der Leber oder Galle kommen kleine sphärische Aggregate vor. Steigt die Konzentration weiter, entwickeln sich große, rutenähnliche, dann lamelläre Orientierungen oder flüssige Kristalle.

Die Zugabe großer Mengen Monohydroxy-Gallensäuren (Lithocholsäure) fördert die Ausbildung großer flüssiger Kristalle bei

Körpertemperatur, was das elektronenmikroskopische und funktionelle Bild der Cholestase entstehen läßt (36). Diese flüssig-kristalline Phase ist zu viskös und wahrscheinlich zu groß, um die canaliculäre Membran zu passieren. Als Folge davon wird die Flüssigkeitssekretion des Hepatozyten in erheblichem Maße beeinträchtigt (27).

### 3.) Veränderte $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase der canaliculären Membran

Wie bereits vorher bei der Beschreibung des GSUGF erwähnt, wird eine  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase medierte  $\text{Na}^+$ -Pumpe als zweiter canaliculärer Pumpenmechanismus vermutet. Gallensalze können den  $\text{Na}^+$ -Transport entweder durch spezifische Interferenz mit dieser ATPase hemmen, oder über die Stimulation unspezifischer alkalischer Phosphatase in der äußeren Microvillusmembran zu einer Entleerung der ATP-Vorräte führen, woraus die Behinderung des GSUGF resultiert (37). Es bestehen jedoch Zweifel über die grundlegende Bedeutung des GSUGF für die Entstehung der Cholestase durch die Tatsache, daß zahlreiche Substanzen, die diese Fraktion im Experiment hemmen, beim Menschen nicht als cholestatisch wirksam bekannt sind (38).

### 4.) Mitochondrien

Auch eine Schädigung der Mitochondrien wurde als auslösende Ursache der Cholestase vermutet. Die elektronenmikroskopisch festgestellten Strukturveränderungen, wie verlängerte, gebogene und sogar zirkuläre Cristae, ließen auf eine mangelnde Energieversorgung der Zelle für den Sekretionsvorgang schließen. Heute neigt man eher dazu, diese Veränderungen als Konsequenz der Cholestase zu sehen; Gallensäuren und Bilirubin in hohen Konzentrationen entkoppeln die oxidative Phosphorylierung, können bei Sekretionsstörungen in der Zelle akkumulieren und dabei die beobachteten Struktur- und Funktionsveränderungen der Mitochondrien hervorrufen (32, 39).

### 5.) Mikrofilamente

In letzter Zeit hat sich das Interesse auf das Cytoskelett

fokussiert, das aus myosinassozierten Aktin-Mikrofilamenten und aus Mikrotubuli besteht.

Dieses Gerüst gewährleistet den Tonus der Zelle. Mikrofilamente wurden um den Gallencanaliculus und dort besonders an den "tight junctions" festgestellt. Diese Mikrotubuli und insbesondere die kontraktilen Mikrofilamente sind an der Gallensekretion beteiligt und regulieren die Gallebildung unter dem Einfluß von Hormonen (40, 41). Möglicherweise agieren die Gallensalze ebenfalls an ihnen. Cytochalasin B, das die Mikrofilamente zerreißt, verursacht eine Cholestase durch Zerstörung des Cytoskelettes der Hepatozyten (42, 43). Phalloidin, ein zyklisches Oktapeptid aus dem Pilz *Amantilla phalloides*, produziert einen Überfluß an Filamenten, hauptsächlich in der pericanaliculären Region und zerstört so die normale Anordnung des Mikrofilament-Netzwerkes (24). Die Gallencanaliculi dilatieren, Mikrovilli verschwinden, es kommt zur erhöhten Permeabilität der tight junctions, und der Gallefluß geht zurück.

Somit rückt die canaliculäre Membran als primäre Lokalisation der Sekretionsprozesse immer mehr in den Mittelpunkt des Geschehens. Dies wird auch elektronenmikroskopisch in Form von Verzerrung und Elimination ihrer Mikrovilli deutlich. DE BROE et al. (43) fanden in Sera von Cholestase-Patienten kleine Vesikel, die hohe Aktivitäten von Membranenzymen, nicht jedoch von intrazellulären Enzymen wie Transaminasen, enthielten. Man nimmt an, daß diese Vesikel abgespaltene Teile hepatozytärer Membranen sind, die bei ihrem Auftreten die schwere Schädigung dieser Strukturen bei Cholestase anzeigen (43).

#### 2.2.2. Hydromechanischer oder duktilär-lobulärer Kreislauf

Dieser Abschnitt befaßt sich mehr mit den Konsequenzen der Cholestase, über die wesentlich mehr Klarheit und Übereinstimmung herrscht, als über die Ursachen:

- Die Dilatation der biliären Passagen tritt sowohl bei der mechanischen, als auch bei der chemisch induzierten Chole-

stase auf. Die Retention der Galle führt zu hepatozytären Läsionen, die weniger durch Bilirubin als durch Gallensalze verursacht werden. Neben der Zunahme des endoplasmatischen Reticulums kann eine Verminderung des Cytoplasmas entstehen, die lichtmikroskopisch als "fedrige Degeneration" deutlich wird.

- Mit der portalen Entzündung geht im weiteren Verlauf eine plexiforme, irreguläre Proliferation der Gallenductuli einher. Diese sind umgeben von entzündlichem Exsudat, welches, wie auch die mitotische Aktivität der Hepatozyten, die Cholestase fördert. Nach und nach kann daraus eine portale und periportale Fibrose resultieren, die bei größerem Ausmaß den ductulären und ductualen Fluß behindern und eine sekundäre intrahepatische mechanische Komponente darstellen kann.
- Dies kommt histologisch in einer irregulär verteilten, periportal Gallenpigmentakkumulation zum Ausdruck, die bei jeder Form länger bestehender Cholestase auftritt und eher ein Hinweis auf die Dauer und das Ausmaß, als auf die Ätiologie ist.

Solch zähes und schrumpfendes Kollagen kann auch zu der beschriebenen portalen Hypertension bei Cholestase beitragen.

### 2.3. Lithocholsäure - Cholestase

Die Erkenntnis der cholestatischen Wirkung der Lithocholsäure kam nicht zuletzt durch die früheren Arbeiten von HOLSTI (1), der bei oraler Gabe zuerst Galle als toxisches Agens erkannte, um dann später über die Gallensäuren zur Isolation der Lithocholsäure als cholestatischem Agens zu gelangen. Nachdem sie als hepatotoxisch erkannt war, begann eine Vielzahl von Experimenten mit dem Ziel, dem komplexen Phänomen der intrahepatischen Cholestase näher zu kommen.

Lithocholsäure (3-OH-Cholansäure) ist eine unter physiologischen Bedingungen beim Säuger vorkommende Gallensäure. Sie

entsteht im Darm über bakteriell enzymatische 7- $\alpha$ -Dehydroxylierung ihres Vorläufers Chenodeoxycholsäure. Unter gewissen Umständen kann eine de novo Synthese aus Monohydroxy-Steroiden vorkommen. Lithocholsäure unterliegt, ebenso wie andere Gallensäuren, mit Taurin oder Glycin (beim Hund nur Taurin) konjugiert, dem enterohepatischen Kreislauf (6, 26). Obwohl diese Gallensäure mit der Galle ausgeschieden wird, limitiert sich ihre Hepatotoxizität beim Menschen normalerweise durch Sulfatierung an der 3-Hydroxylgruppe. Diese Sulfatierung vermindert auch die intestinale Absorption der Lithocholsäure, was die hohe Konzentration in den Faeces bedingt und als metabolischer Schutzmechanismus interpretiert werden kann. So erscheinen unter physiologischen Bedingungen nur sehr geringe Mengen Lithocholat in der Galle (46, 47, 48). Bei manchen progressiven cholestatischen Leberfunktionsstörungen von Kindern und Jugendlichen jedoch wurden im Plasma erhöhte Lithocholatkonzentrationen gefunden, was die Bedeutung dieser Monohydroxygallensäure als cholestatisches Agens unterstreicht.

### 2.3.1. Bisherige Untersuchungen zur Lithocholsäure-induzierten Cholestase

#### Einflüsse auf die Gallensekretion

Zum Studium des Cholestasemodells wurden bereits zahlreiche Tierversuche, hauptsächlich an Labornagern, unternommen. Die Lithocholat-Cholestase ist reversibel, was bereits PRIESTLY (49) an Ratten demonstrierte. Funktionell ergibt sich nach oraler Gabe in vivo eine dosis- und zeitabhängige Galleflußreduktion, wobei noch nicht gänzlich geklärt ist, welcher Anteil des Galleflusses vermindert wird. Jedoch zeigte Lithocholat keinen Effekt auf die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität in der Plasmamembran der Gallencanaliculi, was, wie vorher beschrieben, eine Behinderung des gallensäureunabhängigen Galleflusses unwahrscheinlich erscheinen läßt.

## Morphologische Veränderungen

Zahlreiche Studien zeigen, daß Lithocholat einen primären Effekt auf die Membran des Gallencanaliculus hat (50, 51, 52, 53). Neben einer Dilatation der Gallenkanälchen kommt es bei der Cholestase zum Verlust von Mikrovilli und einer Verdickung des pericanaliculären Ektoplasmas, das zuletzt zu ungewöhnlich lamellenartigen Strukturen umgebildet wird, die in das Lumen des Canaliculus ragen, dieses manchmal sogar auszufüllen scheinen (27, 51). Diese "Lamellen" treten zusammen mit starken Verdichtungen des Mikrofilamentsystems auf, welche bevorzugt am "junctional complex" vorkommen, was einen Angriffsort der Lithocholsäure an diesen aktinhaltigen Filamenten vermuten läßt und wiederum deren Bedeutung an der Entstehung der intrahepatischen Cholestase unterstreicht.

Intrazellulär führt Lithocholat zu einer Zunahme an Lysosomen, einer Dilatation des Golgi-Feldes, einer Zerreißung des rauen und einer Proliferation des glatten endoplasmatischen Retikulums (54).

## Veränderungen in der Membranzusammensetzung

Es ist noch nicht gänzlich geklärt, ob die oben beschriebenen Läsionen mit der Pathogenese der Cholestase in direktem Zusammenhang stehen. Es lassen sich jedoch einige interessante kompositionelle Veränderungen der canaliculären Membran feststellen, welche die physiologischen und ultrastrukturellen Zerrüttungen, die durch Lithocholat entstehen, verdeutlichen.

So berichten mehrere Autoren von einer durch Lithocholat induzierten siebenfachen Steigerung des Cholesteringehaltes der canaliculären Membran, in die auch Lithocholat eingelagert wurde (55, 56). Der Phospholipidgehalt blieb unverändert. Eine ähnliche Wirkung von Lithocholat wird auch an der Erythrozytenmembran beschrieben (11).

COOPER (57) berichtet, daß aus einer derartigen Veränderung des Cholesterin-Phospholipid-Verhältnisses eine dreifache Zunahme der Membranviskosität resultiere, wodurch sich die Per-

meabilität ändere und der Wassertransport durch die Membran reduziert werde (55).

Diese Ergebnisse unterstützen die These, daß Lithocholat einen direkten Effekt auf die makromolekulare Organisation der canaliculären Membran hat.

Im Widerspruch zu den Permeabilitätsbeobachtungen Coopers stehen die Ergebnisse von Clearance-Messungen mit radioaktiv markiertem Erythritol und Inulin. Hierbei ergibt sich zwar auch eine wesentliche Verringerung des canaliculären Galleflusses (Erythritol), die Membranpermeabilität jedoch (Inulin) scheint erhöht. Durch diese "leckenden" biliären Membranen soll es zur Rückdiffusion bereits sezernierter Galle und damit zur Verstärkung der intrahepatischen Cholestase kommen (9).

Einen weiteren Faktor mag die Präzipitation von Lithocholat durch Überschreiten seiner Wasserlöslichkeit in der Galle darstellen. Dies wurde früher überinterpretiert (11, 49, 51, 58). Heute stehen die fundamentalen Veränderungen der molekularen Membranorganisation im Vordergrund (59, 60).

Schutz vor der Lithocholat-Toxizität:

Sulfatierung an der 3-Hydroxylgruppe steigert die Wasserlöslichkeit von Lithocholat beträchtlich. Dieser metabolische Schritt ist sowohl beim Menschen, als auch bei der Ratte nachgewiesen (59, 61, 62). Des weiteren fehlt dieser Verbindung jegliche cholestatische Wirkung, wobei dies wahrscheinlich eher durch verzögerte oder abgeschwächte Membran-Interaktionen bewirkt wird, als aufgrund besserer Ausscheidungsmöglichkeiten in Galle und Urin.

Weitere, bei einzelnen Tierspezies nachgewiesene Metabolisierungsschritte der Lithocholsäure, die zu weniger toxischen Produkten führen, sind (37)

6 - Beta - Hydroxylierung (Ratte)

7 - Alpha-Hydroxylierung (Hamster, Ratte?)

Daraus ergeben sich zur experimentellen Erzeugung einer intrahepatischen Cholestase sehr unterschiedliche, speziesbedingte

Lithocholatdosierungen (37):

|                               |                    |
|-------------------------------|--------------------|
| Ratte, Meerschweinchen, Maus: | 1 g/kg KG          |
| Hamster, Kaninchen:           | 250 mg/kg KG       |
| Huhn:                         | 200 mg/kg KG       |
| Affe:                         | 400 - 600 mg/kg KG |

Für den Hund konnten der Literatur keine genauen Angaben entnommen werden.

Eine vollständige Aufhebung der Lithocholat-Cholestase erreicht man bei gleichzeitiger Verabreichung äquimolarer Mengen Taurocholates, wobei zusätzlich die Gallensekretion noch stimuliert wird. Dieser Effekt wird primär durch die Kapazität des Taurocholates, das Lithocholat in Micellen zu lösen, erklärt (63).

Zusammengefaßt lassen sich die Fakten der Lithocholat-Cholestase wie folgt darstellen:

- 1.) Die orale Gabe von Lithocholsäure ist bei mehreren Spezies erprobt und stellt somit ein reproduzierbares Cholestasemodell dar.
- 2.) Die Lithocholat-Cholestase bewirkt spezifische morphologische Veränderungen des Hepatozyten, seines Cytoskelettes und speziell der canaliculären Membran.
- 3.) Auf diesen Schädigungen der Membranstruktur scheint der Wirkungsmechanismus der Lithocholsäure zu beruhen (Permeabilitätserhöhung).
- 4.) Durch die Gabe micellenbildender Taurocholsäure ist die Lithocholat-Cholestase reversibel.

### 3. Therapie einer Cholestase

#### 3.1. Choleretica (Allgemeines)

Die Erstellung eines Cholestasemodellles soll, wie erwähnt, nicht nur einen Einblick in die pathophysiologischen Mechanismen intrahepatischer Cholestase geben, sondern auch Wege eröffnen, diese therapeutisch anzugehen. Die sich dabei ergebenden Möglichkeiten erstrecken sich auf den Einsatz von Pharmaka, die über die Galle ausgeschieden werden, bei ihrem hepatobiliären Transport mit der Gallebildung interferieren und die Gallesekretion stimulieren.

Hierbei finden seit langer Zeit die verschiedensten Substanzen Verwendung, die sich in vier Gruppen unterteilen lassen (64).

- a) Substanzen mit "gallensäureähnlicher" choleretischer Wirkung (meist Pharmaka, die als glucuronisierte Metaboliten in die Galle ausgeschieden werden und ähnlich wie die anionischen Gallensäuren  $\text{Na}^+$  als Gegenion mitnehmen);
- b) Stoffe, die die Gallensäuresekretion und damit den gallensäureabhängigen Gallefluß erhöhen;
- c) Substanzen, die den gallensäureunabhängigen Gallefluß erhöhen, wobei der aktive Transport von anorganischen Ionen wie  $\text{Na}^+$  in die Galle stimuliert wird ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase!}$ );
- d) Substanzen, die lediglich eine Sekretionssteigerung an den ductulären Epithelien bewirken.

Auf dieser Basis wurden unter anderem von FIEBIGER (65) verschiedene Pharmaka (Clanobutin,  $\gamma$ -Acylaminoalkancarbonsäure, Methylumbelliferon) bei Tauroolithocholatcholestase an der isolierten Rattenleber untersucht. Die ermittelten Parameter waren Gallefluß, Gallensäuresekretion, Phospholipid- und Cholesterinsekretion in die Galle.

### 3.2. Verwendung des Cholereticums Clanobutin

Bei diesen Versuchen erwies sich das Clanobutin als einzig wirksames Cholereticum mit folgenden Eigenschaften:

- 1.) Clanobutin ist in der Lage, die Lithocholat-Cholestase aufzuheben. Dies ist der Fähigkeit des Clanobutins, die Ausscheidung von Tauroolithocholsäure zu erhöhen, zuzuschreiben.
- 2.) Clanobutin ohne Lithocholat-Cholestase hat bei der Sekretion eine osmotische Wirkung.
- 3.) Diese erhöhte Ausscheidung kann nicht, wie z.B. bei Taurocholsäure auf die Bildung von Micellen zurückgeführt werden.

Clanobutin ist der generic name eines von der Firma Byk Gulden entwickelten Pharmakons (Bykahepar<sup>R</sup>).

Chemisch ist Clanobutin eine substituierte Anilincarbonsäure:

4 - [4 - Chlor - N - (4 - methoxyphenyl) - benzamido] -  
Buttersäure

Aufgrund der Ergebnisse bei der Ratte sollte Clanobutin in den vorliegenden Versuchsaufbau integriert werden, um festzustellen, ob sich beim Hund eine ähnlich choleretische Wirkung ergibt, die fähig ist, die experimentelle Lithocholsäurecholestase bei dieser Tierart positiv zu verändern.

Die von BERCHTOLD (66) ebenfalls beim Hund durchgeführten Experimente befaßten sich mit der Wirkung von Clanobutin auf die Gallesekretion, ohne daß vorher eine Cholestase induziert wurde. Er kommt zu dem Ergebnis, daß der Gallefluß zwar erheblich gesteigert werden konnte (max. 238 %), dieser Anstieg aber nicht von einer Zunahme der biliären Gallensäureausscheidung begleitet war (entspricht Punkt 2 der Ergebnisse von FIEBIGER). Messungen am Ende des Experimentes ergaben, daß über 80 % des Clanobutins in die Galle ausgeschieden worden waren.

#### 4. Diagnostik

##### 4.1. Enzyme allgemein

LICHTMANN (67) teilt die Leber in vier anatomische Einheiten auf:

- 1.) Das Parenchym.
- 2.) Das Gallengangsystem - canaliculäre oder cholangioläre Einheit.
- 3.) Die vasculäre, hämodynamische Einheit.
- 4.) Das reticulo-endotheliale System.

Nachdem klinische Anzeichen unmittelbar von den Veränderungen in den pathologisch-anatomisch-physiologischen Einheiten abgeleitet werden, muß die Wahl der Testverfahren und ihre Interpretation unbedingt an diese grundlegenden strukturellen Komponenten angepaßt werden.

Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum sollen frühzeitige Störungen in Organen aufdecken. Berücksichtigt werden besonders solche Enzyme, denen "Organspezifität" nachgesagt wird und durch deren Bestimmung Aussagen über ein bestimmtes erkranktes Organ getroffen werden kann. Darüber hinaus wird die Lokalisation der Enzyme in der Zelle berücksichtigt: Membran-, Cytosol-, Mitochondrienlokalisation. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf Art und Schwere der Störung.

##### Mechanismen der Enzymfreisetzung

Die Veränderungen im Enzymmuster bei Erkrankungen der Leber sind besonders wichtig, da die Enzymverteilung im Serum primär von Konzentrationsgradienten zwischen dem intra- und extrazellulären Raum abhängt. Diese sind so steil, daß ihre Aufrechterhaltung einen beträchtlichen Teil des Energieertrages der Zelle benötigt.

Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation ist das Austreten cytosolständiger Enzyme (wie z.B. GPT) beschleunigt gegenüber

| Struktur<br>(Organellen)                  | Funktion                                                                                                                                   | enzymatische<br>Ausrüstung                                                            |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Gallenkapillaren                          | Ausscheidung von Galle<br>usw.                                                                                                             | alk. Phosphatase<br>γ-Glutamyl-Transferase<br>Leucin Aminopeptidase<br>5-Nucleotidase |
| Lysosomen                                 | intrazelluläre Verdauung und Ausscheidung, die meisten Speicherkrankheiten sind Folge eines lysosomalen Enzymmangels                       | hydrolytische<br>Enzyme (pH 3 - 5)                                                    |
| endoplasmatisches Reticulum<br>a) glattes | Entgiftung(senzyme)<br>Acetylierung,, Methylierung, Reduktion, Oxydation<br>Konjugation von<br>Bromthalein<br>Bilirubin<br>Steroidhormonen | Enzyme treten normalerweise nicht ins Plasma über                                     |
| b) granuläres<br>(Ribosomen)              | Ort der Proteinsynthese, Bildung von nicht enzymatischem und enzymatischem Eiweiß (Sekretionsenzyme)                                       | Albumin, Cholinesterase, Coeruloplasmin, Gerinnungsfaktoren (II, V, VII, VIII, X)     |
| Mitochondrien                             | Reaktionskammern (energielieferndes "Zellkraftwerk")                                                                                       | GLDH (100 %)<br>GOT (70 %)<br>MDH (40 %)                                              |
| Zytoplasmaraum                            |                                                                                                                                            | Indikatorenzyme (erfüllen intrazelluläre Funktion)<br>GOT, GPT, LDH, ALD, SDH         |

Abb. 3: Strukturbezogene, enzymatische Ausstattung der Leberzelle beim Menschen (mod. nach Theuer/Eisenburg (29))

mitochondrialen Enzymen (GLDH), die bereits Symptome der Nekrobiose sind.

Die vielfältigen individuellen Ursachen für das "Leckwerden" von Zellen kann man auf drei Hauptursachen zurückführen (68).

- 1.) Die Disproportion zwischen Bedarf und Versorgung der Zelle mit Sauerstoff.

Diese stellt sich am schnellsten bei der mitochondrialen und acinozentralen GLDH und erst später bei mehr cytosolständigen Enzymen (GPT) ein.

- 2.) Die zweite Hauptursache ist der energetische "Ernährungszustand" der Zelle - das Mißverhältnis zwischen Bedarf und Versorgung mit metabolisierbaren Substraten. (Hungernde Ratten zeigen 2,5- bis 5fach höhere Leberenzymwerte wie gefütterte).

- 3.) Die dritte und bedeutendste Ursache ist eine (toxische) Schädigung der Leberzelle, d.h. die Unfähigkeit der Zelle, ihren Energiebedarf über die Nutzung der Sauerstoff- und Substratversorgung zu decken.

Beim Vergleich verschiedener Formen der Schädigung ergeben sich spezifische quantitative wie auch qualitative Unterschiede des Enzymmusters im Serum, was sowohl durch den Angriffspunkt verschiedener toxischer Substanzen an subzellulären Strukturen als auch durch die Heterogenität der Enzymverteilung innerhalb des Leberläppchens erklärt werden kann.

#### Abbau der Serumenzyme

Nach ihrer Freisetzung gelangen die Enzyme in die Körperflüssigkeiten und verteilen sich darin. Nach und nach werden sie dann in katalytisch aktiver Form eliminiert. Dabei stellte man fest, daß die Zellen der meisten Parenchyme zirkulierende Enzymmoleküle im Zusammenhang mit ihrem jeweiligen Proteinmetabolismus inkorporieren können. Die Konstanz der Eliminationsrate stellt die Basis der diagnostischen Enzymologie dar. Der Plasmaspiegel reflektiert nur Veränderungen im Zufluß. Die

Halbwertszeit zellulärer Enzyme im Kreislauf scheint molekül- und speziesspezifisch zu sein. Es besteht keine Abhängigkeit der Halbwertszeit von Geschlecht, Alter, den meisten Krankheitszuständen und dem momentanen Plasmaspiegel (68).

#### 4.2. Enzyme speziell

Im folgenden sollen die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Parameter näher beschrieben werden:

##### 4.2.1. Die Alkalische Phosphatase (AP) (E.C. 3.1.3.1.)

###### 1.) Allgemeines

Schon ROBERTS (69) beschreibt das Ansteigen der Serum-AP bei Störungen im biliären Trakt. Die Messung wurde als "empirischer" Test bezeichnet, da der Grund für erhöhte Aktivitäten nicht gänzlich geklärt war. Es ergaben sich die unterschiedlichsten Theorien, auf die hier jedoch nicht eingegangen werden soll (70, 71).

###### 2.) Biochemie

In vitro katalysiert das Enzym substratspezifisch die hydrolytische Spaltung verschiedener Phosphatverbindungen.

Der systematische Name der AP lautet Orthophosphorsäuremonoesterphosphohydrolase. Das Aktivitätsoptimum liegt bei pH 9,5, aber auch im Bereich des Blut-pH von 7,4 besteht eine relativ hohe Aktivität (72).

Bei der AP handelt es sich um ein zinkhaltiges Glycoprotein, bestehend aus mehreren Untereinheiten. Dieses Enzym besitzt beim Menschen ein Molekulargewicht (MG) von 125.000, während ein Isolat aus der Schweinenierenrinde ein MG von 154.000 aufweist (73).

###### 3.) Verteilung in der Zelle und in Organen:

Die AP ist ein Membranenzym, d.h. sie ist an die äußere Zellmembran oder andere Membranstrukturen der Zelle wie Golgi-Apparat

parat, Kernmembran etc. assoziiert (74).

Bei Ultrazentrifugation von Gewebehomogenaten findet sie sich entsprechend in der Mikrosomenfraktion.

Histochemisch läßt sich das Enzym beim Menschen in folgenden Organen nachweisen: Leberzelle, Gallengangsepithelien (Ductuli und Canaliculi), Bürstensaum der Dünndarmepithelien, Niere (Mikrovilli des proximalen Tubulussystems), Placenta, laktierende Mamma, Osteoblasten, granulozytäre Leukozyten, Reticulumzellen von Knochenmark und Milz und Endothelien der Blutgefäße (72).

Vergleichende Organanalysen von fünf verschiedenen Tierarten (Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte) ergeben eine sehr ähnliche Verteilung der AP (71).

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung beim Hund:

|               | relative Aktivität<br>(Organ mit höchster<br>Aktivität = 100 %) | absolute Aktivität<br>IU / 1 |
|---------------|-----------------------------------------------------------------|------------------------------|
| Niere         | 100 %                                                           | 50 ± 6                       |
| Leber         | 5 %                                                             | 2 ± 0,3                      |
| Hirn          | 4 %                                                             | 2 ± 0,2                      |
| Skelettmuskel | 0,8 %                                                           | 0,4 ± 0,04                   |
| Herzmuskel    | 0,2 %                                                           | 0,1 ± 0,03                   |

Tab. 1: Verteilung der AP in den Organen des Hundes

Aus dieser Verteilung lassen sich jedoch - wie auch für die Verteilung der GGT - kaum Rückschlüsse auf die klinische Diagnostik ziehen. Die AP dient fast ausschließlich zur Erkennung hepatobiliärer und ossärer Störungen.

#### 4.) Biologische Funktion

Die biologische Funktion der AP im Zellstoffwechsel ist unbekannt. Ihre Lokalisation an Zelloberflächen von Organen mit reger Resorptions- und Sekretionsfähigkeit läßt eine Beteiligung am aktiven Membrantransport vermuten. Wahrscheinlich ist

die in vitro-Eigenschaft, Phosphatester bei alkalischem pH hydrolytisch zu spalten, zufällig und die physiologische Aufgabe eine andere (72). Bekannt ist die Beteiligung der AP an der Fettresorption. Nach fettreichen Mahlzeiten (langkettige Fettsäuren + Cholesterin) kommt es zur "Einschwemmung" der alkalischen Dünndarmphosphatase über Lymphe und Vena portae ins Blut. Der erhöhte Serumspiegel bleibt beim Menschen etwa acht Stunden nachweisbar, bis das Enzym durch die proteinkatabole Aktivität der Leber eliminiert ist. Eine ähnliche Funktion könnte die AP in den Gallenkapillaren haben, bedenkt man den hohen Grad der Galle an Lipiden.

Welche Rolle die AP bei der Knochenbildung spielt, ist nicht bekannt. Die Höhe der Enzymaktivität im Serum bzw. im Knochen korreliert mit der Zahl der Osteoblasten und ihrer Tätigkeit.

## 5.) Klinische Aspekte

### a) Normalwerte

Die in der Literatur angegebenen Referenzbereiche der AP beim Hund sind aufgrund unterschiedlicher Bestimmungsmethoden nur begrenzt vergleichbar.

KRAFT et al. (75):           bis 190 IU/l

KELLER (71):               bis 242 IU/l

Hierbei ist zu bemerken, daß bei Jungtieren im Wachstum bis zu 2,5fach höhere Aktivitäten als physiologisch angesehen werden können (75).

### b) Isoenzymuntersuchungen

Die Differenzierung der AP verschiedener Herkunft im Serum und damit die Identifizierung des Ursprungsorgans und die Erkennung pathologischer Enzymmuster gelingt durch elektrophoretische Auftrennung in Stärke- oder Polyacrylamidgel und durch die Anwendung verschiedener Modifikationen wie Hemmung durch L-Phenylalanin, Hitzestabilität, Hemmung durch Harnstoff etc. (76, 77, 78). Isoenzymbestimmungen dienen auch in der Humanmedizin mehr zum Verständnis pathophysiologischer Mechanismen.

Ihre Bestimmung, die von NAGODE (76) auch auf den Hund übertragen wurde, bringt kaum diagnostische Vorteile. Ihr Hauptanwendungsgebiet - die Unterscheidung zwischen hepatobiliären und ossären Erkrankungen - läßt sich einfacher über die zusätzliche Bestimmung der GGT abdecken, die bei Knochenprozessen keinen Aktivitätsanstieg zeigt.

c) Mechanismen der Aktivitätserhöhung unter pathologischen Bedingungen

Bei hepatobiliären Erkrankungen kommt es zum Anstieg der AP im Serum durch (72):

- Vermehrten Enzymaustritt aus der Leberzelle bei Zellschädigung;
- gesteigerte Enzymproduktion der Leberzelle;
- hepatozelluläre Abbaustörungen der ständig weiterhin in das Blut gelangenden AP intestinalen, ossären und hepatobiliären Ursprungs;
- Schädigung der Gallenkapillaren durch Entzündung oder Obstruktion mit Regurgitation des biliären Isoenzym ins Blut.

Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang Biopsiebefunde von Hunden, die zwischen zwei und vier Wochen gallengangsliigiert waren. Man fand dilatierte Canaliculi mit Gallenausgüssen, die von AP umgeben waren (79).

Einen Beweis der gesteigerten Enzymproduktion lieferten mehrere Autoren durch den Einsatz von Proteinsynthesehemmern (Cycloheximid), nach deren Anwendung es bei Versuchen mit gallengangsliigierten Ratten zur Unterdrückung des Anstiegs der Leberphosphatase um 38 % und der Serumphosphatase um 80 % kam, während die Reaktion der GPT, die unabhängig von einer de novo-Synthese ist, nach der Gallengangsobstruktion unverändert blieb (80, 81).

Der Vergleich der AP- wie auch GGT-Enzymaktivitäten in der Leber und im Serum des Menschen bei Cholestase zeigt, daß sich die gesteigerte Synthese nur dann in einem gewissen Ausmaß im

Serum offenbart, wenn die Cholestase durch Permeabilitätsstörungen kompliziert wird, wie sie bei jeder entzündlichen Lebererkrankung auftreten (68, 79).

Die beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen tragen in unterschiedlichem Ausmaß zum Enzymanstieg bei.

- Bei einer akuten Hepatitis mit geringen bis mäßigen Enzymanstiegen liegt eine hepatozelluläre Abbaustörung vor, das Isoenzymmuster bleibt normal.
- Die akute Hepatitis mit cholestatischem Einschlag ist charakterisiert durch hohe AP-Werte, die durch den Übertritt des biliären Isoenzym ins Blut verursacht werden.
- Bei chronischen Hepatitiden finden sich keine oder nur mäßige Enzymanstiege.
- Bei der Leberzirrhose kommt es aufgrund des verminderten Katabolismus der Leber zum verlangsamten Abbau und damit zu mäßigen AP-Erhöhungen; insbesondere findet sich das intestinale Isoenzym überproportional erhöht.
- Die hohen Enzymaktivitäten bei der biliären Zirrhose entstehen durch den selektiven Anstieg des biliären Isoenzym.
- Toxische Hepatosen weisen entsprechend ihrer Ausprägung unterschiedliche AP-Aktivitäten auf:
  - gering vermehrte AP beim Hepatitis-Typ
  - normale AP beim Fettleber-Typ
  - hohe Aktivitäten beim cholestatischen Typ
- Geringe Erhöhungen der AP finden sich auch bei der Stauungsleber.

Der Anstieg der AP bei Gallenwegserkrankungen entsteht durch Übertritt des biliären Isoenzym ins Blut. Je nach Ausmaß der Leberparenchymbeteiligung ist auch das hepatozelluläre Isoenzym erhöht. Zu dieser Gruppe von Erkrankungen zählen die Cholangitis und Cholangiolitis, die, wie von POPPER (32) beschrieben, im Verlauf jeder Cholestase auftritt, aber auch der

inkomplette oder komplette Verschluß der Gallenwege durch Konkrementen, wie er z.B. für die Lithocholatcholestase speziell bei der Ratte beschrieben ist (49, 51, 52, 82).

d) Das Verhalten der AP im Serum unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Im Serum erfüllt die AP keine erkennbare Funktion. Während beim erwachsenen Organismus die Leberphosphatase die Hauptfraktion stellt, ist bis zum Ende des Skelettwachstums die Knochenphosphatase stark vertreten. Sie führt u.a. beim Hund, wie beschrieben, bis zur 2,5fachen, neuerdings festgestellt sogar bis zur 4fachen Erhöhung der Normalaktivität (75). Die dritte Komponente, die Dünndarmphosphatase, wurde beim Menschen in bis zu 60 % der Nüchternsera gefunden. Ein blutgruppenabhängiger Gehalt der Dünndarmschleimhaut an AP wird diskutiert (72). Bei der Ausscheidung bzw. dem Abbau der Serum-AP nimmt die Leber die zentrale Stellung ein.

Die AP aus den Gallenkapillaren ist normalerweise ausschließlich in der Galle nachweisbar. Nur bei extra- und intrahepatischer Cholestase erscheint sie im Serum. Die Alkalische Phosphatase aus den Leberparenchymzellen findet sich im Serum und in der Galle. Die Isoenzyme aus Knochen und Dünndarm konnten auch unter pathologischen Bedingungen nie in der Gallenflüssigkeit nachgewiesen werden. Sie werden wie andere Eiweißkörper in der Leberzelle abgebaut.

Die Bestimmung der AP gehört auch in der Tiermedizin, speziell beim Hund, zu den bevorzugten Leberdiagnostika. Bei extrem hohen Serumaktivitäten muß an eine intra- oder extrahepatische Cholestase gedacht werden. Eine Differenzialdiagnose zwischen beiden ermöglicht die AP-Bestimmung jedoch nicht (83).

So stieg bei einem Versuch von VAN VLEET und ALBERTS (84) die Serum-AP nach Gallengangsligatur zuerst langsam, dann aber schnell an und erreichte am siebten Tag Maximalwerte, die das 17fache der Ausgangsaktivität betragen.

DALTON (85) berichtet von einem Fall intrahepatischer Cholestase ungeklärter Genese beim Hund. Die Serum-AP-Werte betrugen bis zum 60fachen der Norm und waren mit der letzte Parameter, der sich normalisierte.

Toxische Leberschädigungen, wie sie durch die Verabreichung von Phenobarbital oder Insektiziden verursacht werden, führen ebenfalls zu erhöhten AP-Werten (GGT-Aktivitäten hier auch erhöht!) (86, 87). Im Gegensatz zu Gallenwegsbehinderungen provozieren Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCl}_4$ )-Vergiftungen reine Parenchymschäden. Beim Hund reagiert in der Regel die GPT am empfindlichsten, während die AP nur mittel- bis geringgradige Aktivitätserhöhungen aufweist (84, 88).

Bei primären Lebergeschwülsten, Lebermetastasen (obstruktive Komponente), lymphatischer Leukose mit Leberbeteiligung, fettiger Leberdegeneration und kontagiöser Hepatitis zeigt die AP eine deutliche Erhöhung des Plasmaspiegels (89).

Ähnlich wie in der Humanmedizin reagiert die AP bei Stauungsleber nur in einem Teil der Fälle (90). FREUDIGER (91) beschrieb einen 36fachen Serum-AP-Anstieg bei einem Spitz mit nekrotisierender Pankreatitis und einer fettig degenerierten, nekrotischen Leber mit Hyperplasiyeknoten, weiter eine fünffache AP-Aktivitätszunahme bei zwei Hunden mit Lebermetastasen von Pankreaskarzinomen.

#### e) Diagnostische Bedeutung der AP bei hepatobiliären Erkrankungen

Die Erkennung und Differenzierung dieser Erkrankungen beruhen zu einem wesentlichen Teil auf der Interpretation mehrerer Enzyme, nicht auf der Bestimmung eines einzelnen.

Die AP ist bei sehr vielen hepatobiliären Erkrankungen erhöht und ihre Bestimmung daher indiziert und sinnvoll. Hinweisscharakter und differenzialdiagnostischen Wert hat sie bei der Beurteilung der Cholestase. Sie ist ein selektives Enzym für Gallenwegserkrankungen (29). Bei Cholestasen im fortgeschrittenen Lebensalter ist die Aktivität der AP meist lange vor

dem Anstieg des Bilirubins erhöht (71).

Auch beim Hund reagiert die AP zuverlässig und oft mit sehr hohen Plasmaspiegeln. Sie ist deshalb gut zur Aufdeckung von Lebererkrankungen geeignet (4, 71, 76, 83, 90, 92).

Die Alkalische Phosphatase empfiehlt sich ferner zur Verlaufskontrolle akuter Erkrankungen (83, 85).

Es ist eine Eigentümlichkeit des Enzyms beim "akuten Leberschaden" gegenüber der GOT und GPT, erst etwa zwei bis drei Tage später pathologische Werte zu erreichen. Andererseits ist die AP zumeist das letzte Enzym, das in den Normalbereich zurückkehrt, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß sie bedeutend langsamer eliminiert wird (83).

#### 4.2.2. Die Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT)

( E.C. 2.3.2.2. )

##### 1.) Allgemeines

Die Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT) wurde von HANES et al. (93) in einem Schafnierenextrakt, später auch in Rinderpankreas, Rinderniere und laktierender Milchdrüse gefunden. Jahre später wurde das Enzym auch in Gehirn- und Lebergewebe entdeckt (94).

##### 2.) Biochemie

Die GGT ist ein Enzym des  $\gamma$ -Glutamylzyklus und somit am Aminosäuren-Transport beteiligt. Sie katalysiert die Transpeptidation zwischen Glutamylpeptiden (Glutathion) und den meisten vorkommenden Aminosäuren außer Prolin. Bei diesem Transfer handelt es sich teilweise um einen reversiblen Prozeß (95). Die GGT ist, zumindest bei Rind und Schwein, ein Glycoprotein mit ca. 20 % Zuckeranteil und einem Molekulargewicht von 90.000.

##### 3.) Verteilung in der Zelle und in Organen

Wie die AP ist auch die GGT hauptsächlich in der mikrosomalen Fraktion vertreten. Sie ist fest an Zellmembranen gebunden und

nur durch Detergentien oder Ultraschall zu lösen (71, 96). Von SZEWCZUK (97) wird für den Menschen ein Lebercytosol-Anteil diskutiert, der jedoch weniger als 10 % der Gesamt-Leberaktivität beträgt.

Beim Menschen kommt die GGT in den meisten Geweben vor, jedoch sehr unterschiedlich verteilt. Die höchste Aktivität findet sich in der Niere (rel. GGT-Aktivität 90 - 100 %), hier wieder in den Tubuluszellen. Es folgen das Pankreas mit 8,3 %, Leber 3,9 %, Milz 1,5 %, Dünndarm 0,9 % (98). Auch in anderen Organen wie Milchdrüse, Knochenmark, Prostata, Augenlinse sowie in den Samenbläschen, der Placenta, der Gebärmutter und in den Tuben wurde die GGT nachgewiesen.

In den Körperflüssigkeiten ist die GGT-Aktivität geringer. Man findet die relativ höchsten Werte in der Samenblasenflüssigkeit und in der Galle (je 30 %), im Nabelschnurserum (10 %), Fruchtwasser, Pankreassaft und Harn zu 3,6 und 7 %. Im Liquor und im Sputum sind nur Spuren, im Serum etwa 1 % der Gesamtkaktivität enthalten (99).

Der Hund hingegen zeigt eine etwas andere Verteilung der GGT in den Organen. Beim Hund lassen sich nach den Analysen von KELLER (71) erhebliche Quantitäten nur in der Niere nachweisen, wie aus folgender Tabelle ersichtlich wird.

Tab. 2

|               | <u>relative Aktivität</u>           | <u>absolute Aktivität</u> |
|---------------|-------------------------------------|---------------------------|
|               | (Organ mit höchster Aktiv. = 100 %) | in IU / l                 |
| Niere         | 100 %                               | 16 ± 3                    |
| Leber         | 1 %                                 | 0,1 ± 0,02                |
| Hirn          | -                                   | 0                         |
| Skelettmuskel | -                                   | 0                         |
| Herzmuskel    | -                                   | 0                         |

Bei näherer Untersuchung der Leber finden sich GGT-Aktivitäten im gER des Hepatozyten (mikrosomale Enzyminduktion (95). Höchste Aktivitäten werden in den Gallencanaliculi und im

Gallengangsepithel gefunden, wo dieses Enzym zum Lumen hin lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu ist die Aktivität besonders gering in den sinusoidalen Membranen und im Bindegewebe der portalen Region (79, 100).

Unter pathologischen Verhältnissen zeigen sich beim Menschen folgende Reaktionen:

Beim Verschlußikterus ergeben sich die relativ höchsten Aktivitäten in den Gallencanaliculi und nur sehr geringe Aktivitäten in den Arealen der Degeneration und Nekrose, die durch Gallethromben verursacht wurden.

Bei Leberzirrhose ist die GGT-Aktivität in den Gallencanaliculi und sinusoidalen Membranen der Pseudolobuli mit denen der normalen Leber vergleichbar.

Das auffälligste Ergebnis ist die sehr hohe GGT-Aktivität in den Fibroblasten und dem Bindegewebe in den Gebieten neuer Bindegewebsproliferation (100, 101). Hieraus lassen sich bereits gewisse Rückschlüsse auf die biologische Funktion ziehen.

#### 4.) Biologische Funktion

Die biologische Funktion der GGT ist bis heute noch nicht sicher geklärt. Der Gamma-Glutamyl-Zyklus stellt in der Niere einen Mechanismus für den Aminosäuretransport aus dem glomerulären Filtrat innerhalb des proximalen Tubulus dar (102, 103). Dieser Zyklus findet wahrscheinlich auch im Gehirn und anderen Geweben statt. Anhaltspunkte dafür ergeben sich aus der weiteren Lokalisation der GGT in den verschiedenen Drüsenepithelien, die als besonders aktiv in bezug auf Bildung bzw. Resorption von Aminosäuren angesehen werden (98).

Weiterhin soll die GGT an der Peptid- und Proteinsynthese mitwirken, indem sie Gamma-Glutamyl-Gruppen von Glutathion abspaltet und diese Spaltprodukte für neue Verbindungen verfügbar macht (104, 105). Hierfür spricht die erhöhte GGT-Aktivität bei Neugeborenen und die signifikante Korrelation zwischen GGT und dem Proteingehalt der menschlichen Milch (106).

Der erwähnte hohe GGT-Gehalt der fetalen und Neugeborenenleber läßt einige Autoren vermuten, daß eine Verbindung zwischen diesen Verhältnissen und den hohen GGT-Aktivitäten bei Lebererkrankungen des Erwachsenen besteht (107).

Da unter natürlichen Bedingungen hauptsächlich Glutathion als Substrat fungiert, wäre es denkbar, daß die GGT an der Regulierung des Gewebe-Glutathion-Spiegels beteiligt ist. Dies führt auch zu Hypothesen über die Beteiligung der GGT per se an Leberschäden: Bei starkem Absinken des Glutathionspiegels kommt es in der Leber zu Nekrosen. Diese Nekrosen werden durch Metaboliten verursacht, die beim Abbau von Glutathion entstehen, sich kovalent an Leber-Makromoleküle binden und dadurch den Zelltod bedingen. Eine endgültige Klärung steht noch aus (108, 109).

## 5.) Klinische Aspekte

### a) Normalwerte:

Aus der Literatur ergeben sich für den Hund folgende Referenzbereiche der GGT im Serum:

|                                       |      |
|---------------------------------------|------|
| 1,8 IU/l [ nicht aktivierte Methode ] | (71) |
| bis 6 IU/l [ aktivierte Methode ]     | (75) |

### b) Isoenzymuntersuchungen:

PATEL (110) weist für jedes von ihm beim Menschen untersuchte Gewebe (Darm, Knochen, Leber, Pankreas und Niere) ein charakteristisches Isoenzymmuster nach, gibt aber keine Angaben über deren Verhalten bei Krankheiten. KOKOT et al. (111) stellen fest, daß beim Menschen, ähnlich wie bei Hund und Kaninchen, der Hauptteil der Serum-GGT-Aktivität in der (elektrophoretisch aufgetrennten) Alpha 1- und Alpha 2-Globulin-Fraktion zu finden ist. Bei verschiedenen inneren Erkrankungen, insbesondere bei Leber- und Gallenwegserkrankungen, kommt es zu einem unspezifischen Anstieg der GGT-Aktivität hauptsächlich in den Beta- und Gamma-Globulinfraktionen. Verbindliche Rückschlüsse auf das Wesen eines Krankheitsprozesses lassen sich aus der Verteilung der GGT in den einzelnen Bluteiweißfraktionen nicht ziehen (111, 112, 113).

### c) Mechanismen der Enzymfreisetzung

Experimentelle und klinische Studien weisen auf die gesteigerte Synthese von Enzymprotein als Mechanismus für die Erhöhung der Serum-GGT hin. Dies gleicht in gewisser Weise dem Mechanismus bei der Synthese der AP (77). Vor dem Anstieg im Serum wird eine Aktivitätsanreicherung im Lebergewebe gefunden (100).

Die bei der AP bereits erwähnten Versuche mit Inhibitoren der Proteinsynthese (Cycloheximid) erbrachten auch bei der GGT eine Hemmung ihrer Aktionsanstiege (68, 81). Außerdem sehen die Autoren ihre Hypothese durch frühere Ergebnisse bestätigt, welche nicht nur eine signifikante Korrelation zwischen GGT und Cholinesterase, einem empfindlichen Indikator der Leberproteinsynthese, ergaben. Auch fanden sie niedrigere GGT-Werte bei fortgeschrittener atrophischer Zirrhose im Vergleich zu leichter Zirrhose mit Lebervergrößerung (95).

Ein weiterer Hinweis für die Neusynthese des Enzyms ist die Induzierbarkeit der GGT-Aktivität in der Leber durch verschiedene Substanzen. Zu diesen gehören Kortikosteroide, Oestrogene, Narkotika insbesondere Halothan, Sedativa und Antiepileptika, Karzinogene und Äthanol. Metallionen wie Zink, Kobalt, Aluminium und Kupfer gelten als Inhibitoren der GGT (77, 114).

Wie bei der AP spielt auch beim Erscheinen hoher GGT-Aktivitäten im Serum eine Permeabilitätsstörung z.B. durch Entzündung der Leber die entscheidende Rolle (68).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß sich Nahrungsaufnahme, physische Belastung und Antibiotikamedikation nicht auf die GGT-Aktivitäten auswirken (77, 115).

### d) Verhalten der GGT im Serum unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Beim Vergleich mit humanmedizinischer Literatur ergeben sich erhebliche Unterschiede in der Aussagekraft der GGT bei Mensch und Tier. So schreibt ZINSER (99) für den Menschen: "In der Differentialdiagnose raumfordernder Prozesse der Leber und der

Gallenabflußhindernisse übertrifft die GGT die anderen cholestaseanzeigenden Enzyme (AP, LAP, 5'-Nucleotidase) sowohl an Sensibilität, als auch an Spezifität. Somit gilt heute die GGT als empfindlichster Test zur Erkennung einer Obstruktion der Gallenwege. Jedoch können auch Erhöhungen der GGT bei akuter und chronischer Hepatitis, bei Leberzirrhose, bei Fettleber, bei Lebertraumen, sowie bei Karzinomen und Metastasen in der Leber beobachtet werden."

SZASZ (116) fand bei Untersuchungen an 250 Patienten mit Hepatopathien bei 93 % eine GGT-Aktivitäts-Erhöhung, bei 62 % eine AP-Aktivitäts-Erhöhung. Wie bereits oben erwähnt, treten die relativ höchsten pathologischen Aktivitäten der GGT bei allen mit Cholestase einhergehenden Hepatopathien auf, so z.B. bei der Hepatitis mit Cholestase, Cholelithiasis mit und ohne Ikterus und cholestatischem Ikterus (104, 117, 118).

Eine Differentialdiagnose zwischen intra- und extrahepatischem Ikterus kann dabei anhand des Enzymanstieges nicht erfolgen, obwohl die GGT-Werte im allgemeinen bei intrahepatischer Cholestase weniger hoch ansteigen sollen als bei der extrahepatischen (95, 114, 119). Die Zahlenangaben über GGT-Aktivitäten bei Cholestasen bewegen sich im Durchschnitt zwischen dem 4,5- und 15fachen der Norm (101, 118).

Das zweite "Spezialgebiet" betrifft die Diagnostik von Lebertumoren beim Menschen, wobei besonders bei Metastasen extrem hohe Aktivitäten auftreten (101, 118). Histologisch ist interessant, daß bei metastatischem Lebergewebe die GGT am höchsten in Gallencanaliculi von Leberzellen ist, die durch Metastasen komprimiert werden (100).

Den wohl größten Anwendungsbereich findet die GGT als Indikator alkoholbedingter Leberschäden und als "Monitor der Abstinenz". So soll am Tag nach Aufnahme von 80 g Alkohol die GGT-Aktivität um 40 bis 100 % ansteigen. Bei chronischen Alkoholikern sinkt sie nach Entzug erst binnen acht Wochen auf die Normalwerte, um nach neuerlicher Aufnahme von Alkohol als erster Parameter wieder anzusteigen, wobei die Erhöhung der En-

zymaktivität sogar größer sein kann als zu Zeiten des Abusus. In einem Fall betrug die Aktivität bis 3400 IU/l gegenüber der Normalaktivität bis 30 IU/l (114).

Beim Vergleich der GGT mit der AP soll die GGT bei extra- und intrahepatischer Cholestase etwa sechsmal so empfindlich reagieren wie die AP. Speziell bei Patienten mit intrahepatischer Cholestase verschiebt sich dieses Verhältnis noch extremer. Die AP soll hier noch schlechter reagieren und von der GGT um den Faktor 10 an Empfindlichkeit übertroffen werden.

Dieselben Unterschiede lassen sich auch bei der Rückkehr der Enzyme in den Normalbereich beobachten. Die GGT-Aktivitäten bleiben wesentlich länger abnorm hoch als die der AP (120). Die Halbwertszeit der menschlichen GGT beträgt drei bis vier Tage, die der AP drei bis sieben Tage (121).

Vergleicht man GGT und Bilirubinspiegel, so zeigt sich keine Korrelation. Die GGT-Erhöhung ist mehr betont in Fällen mit niedrigem Bilirubinspiegel. Bei Erkrankungen des biliären Systems ohne Ikterus ist die GGT in über 85 % der Fälle um mehr als das Zehnfache erhöht. Bei hohen Bilirubinspiegeln kommt es zum Anstieg der GGT, jedoch nicht so auffällig wie bei geringem Ikterus (122, 123).

Die GGT verhält sich bei Tieren sehr unterschiedlich. Besitzt sie, wie heute feststeht, bei der Katze keinerlei diagnostische Bedeutung (124), so gilt sie beim Pferd als brauchbarer und wertvoller Indikator einer Hepatopathie (75, 125). Über die Eignung der GGT als Diagnostikum beim Hund bestehen Zweifel. So finden sich in der Literatur nur sporadisch Hinweise auf das Verhalten der GGT bei Hepatopathien. Sie wird von den meisten Autoren als Leberdiagnostikum beim Hund trotz ausführlicher Untersuchungen nicht erwähnt (4, 71, 83, 85, 92, 126, 127, 128).

Rein experimentelle Ergebnisse anderer Autoren sind zum Teil widersprüchlich:

ARONSEN (79) stellte bei Hunden mit ein- bis zweiwöchiger Gallengangsligatur keine Veränderung der GGT-Aktivitäten in der

Leber fest. Nach drei Wochen biliärer Stase kam es zu einem deutlichen Aktivitätsverlust dieses Enzyms. Dagegen beschreiben NOONAN und KOKOT (96) "signifikante und langanhaltende Anstiege nach Ligatur", die sich in letzterem Versuch 13 Tage nach Gallengangs fistelung wieder normalisierten.

Die häufig beschriebene mangelnde Reaktion der GGT auf Tetrachlorkohlenstoffintoxikation (84, 88, 96) ist ein weiterer Hinweis auf die mäßige Verwertbarkeit dieses Enzyms zur Diagnose von Hepatopathien des Hundes, mag aber generell auch mit der spezifischen Lokalisation und mit dem besonderen Freisetzungsmechanismus dieses Enzyms in Zusammenhang stehen.

#### e) Diagnostische Bedeutung der GGT

Obwohl die Aktivität der GGT in der Niere um ein Vielfaches höher ist als in der Leber, betrifft das klinische Anwendungsgebiet der GGT-Bestimmung im Serum bisher fast ausschließlich die Erkrankungen der Leber und der Gallenwege (129).

Wie bereits erwähnt, gehört die GGT in der Humanmedizin zusammen mit der AP, LAP und 5'Nucleotidase zu den "cholestaseanzeigenden" Enzymen. Sie hat sich dort als einer der sensibelsten Parameter und als ausgesprochen wertvoller Suchtest in der Diagnostik der Leber- und Gallenwegserkrankungen erwiesen. Speziell bei Gallenwegserkrankungen werden die anderen "cholestaseanzeigenden" Enzyme von der GGT hinsichtlich Frühzeitigkeit, Ausmaß und Dauer der Aktivitätsanstiege übertroffen (99, 120).

In der Tiermedizin steht im Vergleich zur Humanmedizin die diagnostische Bedeutung der GGT weit zurück. Speziell beim Hund ist der Wert der GGT-Bestimmung bei Erkrankungen der Leber nicht eindeutig geklärt, jedoch besteht bei erhöhten AP-Werten eine gute Abgrenzungsmöglichkeit der hepatogenen von den ossären Ursachen des Aktivitätsanstieges, da die GGT bei Knochenerkrankungen normale Aktivität zeigt (95, 130, 131).

#### 4.2.3. Die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) ( E.C. 1.4.1.3. )

##### 1.) Allgemeines

Bereits 1920 wies THUNBERG (zit. aus 132) im Froschmuskel ein Enzym nach, das in Gegenwart von Glutaminsäure eine Reduktion von Methylenblau verursacht. Außer in tierischen Organismen wurde es auch mit jeweils unterschiedlichen Coenzymen in Bakterien, Hefen und Fusarien nachgewiesen (133).

Die Enzymkommission der Internationalen Gesellschaft für Biochemie empfahl die Bezeichnung L-Glutamat: NAD, NADP, NAD(P); Oxidoreduktase (desaminierend) als systematischen Namen, wobei NAD(P) das Coenzym im Warmblütergewebe ist (1.4.1.3.) (133).

##### 2.) Biochemie

Die GLDH ist ein weniger substratspezifisches Enzym. Für die oxidative Desaminierung kommen außer L-Glutamat auch L-Valin, L-Leucin und andere Aminosäuren, des weiteren auch  $\alpha$ -Ketosäuren wie Ketovaleriansäure, Ketobuttersäure etc. in Frage (134).

Die physiologisch und auch metabolisch bedeutendste Biokatalyse ist die reversible Umwandlung von Glutamat zu Ketoglutarat.

Reindarstellungen aus Rinderleber ergaben ein Molekulargewicht von etwa 1.000.000. Das pH-Optimum liegt im Durchschnitt bei pH 7,6 (135).

Die GLDH ist ein zinkhaltiges Enzym, wobei je vier Fragmente durch ein Zinkatom zu einer enzymatisch aktiven Einheit gekoppelt werden (29). Dieses zentrale Zinkatom ist auch der Ansatzpunkt der mehrfach beschriebenen Inhibition der GLDH durch Metallkomplexbildner. Eine andere Wirkungsweise zeigen Hemmstoffe der GLDH wie Thyroxin und Steroidhormone (Östradiol, Diäthylstilboestrol, Progesteron und Kortikosteroide), die durch Spaltung des Fermentes wirksam werden (135).

### 3.) Verteilung in der Zelle und in Organen

Die GLDH ist bei allen Organanalysen als eindeutig mitochondriales Enzym charakterisiert worden, wobei sich die Leber ausnahmslos als enzymreichstes Organ erwies (71, 136). Wesentlich niedrigere GLDH-Aktivitäten waren bei den von KELLER (71) untersuchten Spezies (Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Ratte) in der Niere und in abnehmender Reihenfolge auch in Hirn und Herzmuskel zu finden.

Eine Übersicht über die Verhältnisse beim Hund gibt Tabelle 3.

Tab. 3

|               | <u>relative Aktivität</u><br>(Organ mit höchster Aktivität = 100 %) | <u>absolute Aktivität</u><br>in IU / l |
|---------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| Leber         | 100 %                                                               | 103 ± 8                                |
| Niere         | 49 %                                                                | 51 ± 3                                 |
| Hirn          | 16 %                                                                | 16 ± 1                                 |
| Herzmuskel    | 9 %                                                                 | 9 ± 1                                  |
| Skelettmuskel | 2 %                                                                 | 2 ± 0,5                                |

Interessant ist auch die Verteilung der GLDH innerhalb des Leberläppchens. Die Parenchymzellen im perizentralen Bereich des Läppchens haben eine deutlich höhere GLDH-Aktivität als die peripher lokalisierten Zellen, was dadurch bedingt ist, daß Leberzellen nahe der Zentralvene wesentlich mehr Mitochondrien besitzen. Dies ist als Anpassung des Hepatozyten an die zur Zentralvene hin abnehmende Sauerstoffsättigung und Substratkonzentration zu sehen (137).

Diese Anordnung ist nicht zuletzt von pathogenetischem Interesse, denn vom Enzymverteilungsmuster (z.B. GPT mehr periportal, GLDH perizentral) lassen sich gewisse Rückschlüsse auf die primäre Angriffsregion einer Noxe ziehen. Tetrachlorkohlenstoff führt vornehmlich zu perizentralen Läsionen. Folglich ist das Verhältnis GLDH / GPT bei einer  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation relativ hoch verglichen z.B. mit einer Thioacetamidintoxikation, die mehr periportale oder intermediäre Schäden setzt und ein entsprechend niedriges Verhältnis der beiden Enzyme bedingt (137).

#### 4.) Biologische Funktion

Durch die Katalyse der reversiblen Umwandlung von Ketoglutarat zu Glutamat entsteht eine Verbindung zwischen dem Aminosäurenstoffwechsel und dem Zitronensäurezyklus. Dies führt zu einer zentralen Stellung der GLDH im Stoffwechsel; der freiwerdende Ammoniak wird beim Säuger in der Leber über den Harnstoffzyklus in Harnstoff umgewandelt und somit "entgiftet" (5) (siehe Abbildung).

Die gute Reversibilität der GLDH-Reaktion ermöglicht durch Koppelung mit den Transaminasen die Fixierung von freiem Ammoniak und die Bildung von Aminosäuren. Außerdem ist die jeweils mögliche Bindung oder das Freiwerden von  $\text{NH}_3$  für den Säure-Basenhaushalt des Organismus von Bedeutung (138).

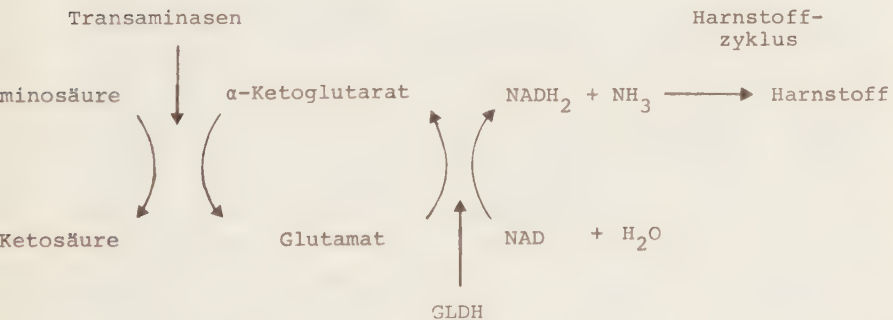


Abb. 4: Die Stellung der GLDH im Stoffwechsel

#### 5.) Klinische Aspekte

##### a) Normalwerte

Aus der Literatur ergeben sich für den Hund folgende Referenzbereiche:

|                  |                      |           |
|------------------|----------------------|-----------|
| bis 6 IU/l       | aktivierte Methode   | (75)      |
| 3,1 IU/l         | nicht aktiv. Methode | (71)      |
| 0,24 - 2,18 IU/l | nicht aktiv. Methode | (83, 132) |

Die Werte sind jedoch infolge unterschiedlicher Bestimmungsmethoden nur schlecht zu vergleichen.

b) Isoenzyme

Elektrophoretisch konnten bis zu sechs Isoenzyme der Leber-GLDH nachgewiesen werden. Ihr Vorkommen blieb jedoch bisher ohne klinische Bedeutung (139).

c) Mechanismen der Enzymfreisetzung unter pathologischen Bedingungen

Für den Anstieg der GLDH im Serum werden ausschließlich schwere Zellschäden, die zur Nekrose und damit zur Veränderung der Mitochondrien führen, verantwortlich gemacht (75, 137).

d) Verhalten des Enzyms im Serum unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Die GLDH gehört zu den sogenannten "plasmaunspezifischen" Enzymen, deren physiologische Aktivität im Blut nur durch die Erhöhung der Permeabilität der zellulären Membranen im biologischen Rhythmus der Zellmauserung zu erklären ist. Für die menschliche Leber besteht eine Protein-Halbwertszeit von zehn Tagen gegenüber 80 Tagen für das gesamte menschliche Körperprotein (140), was die Rolle dieses Organs als Quelle "plasmaunspezifischer Enzyme" erklären könnte. Die Halbwertszeit der Enzymelimination beträgt beim Menschen für die GLDH etwa  $18 \pm 1$  Stunden.

Die Eliminationsgeschwindigkeit der GLDH beim Hund ist bisher noch nicht bekannt (83).

Für die GLDH scheint keine Abhängigkeit der Serumaktivität von Alter, Geschlecht, Tageszeit und körperlicher Belastung zu bestehen (71, 81). Aus dem speziellen Verteilungsmuster und der Lokalisation der GLDH ergibt sich, daß das Ausmaß ihres Aktivitätsanstieges - verglichen mit dem der cytoplasmatischen GPT und der nur teilweise mitochondrialen GOT - auch bei erheblichen Leberschäden nur relativ gering ist (29, 137).

Untersuchungen über das Verhalten der GLDH bei Lebererkrankungen

kungen des Menschen (141) ergeben bei den meisten Patienten mit akuter Hepatitis oder mit inaktiver Zirrhose nur mittel- bis geringgradig über die Norm hinausgehende GLDH-Aktivitäten. Beim dystrophischen Schub chronischer Hepatitiden imponieren jedoch erhebliche GLDH-Anstiege. Gallengangsverschlüsse verursachen häufig hohe Aktivitäten der GLDH. So wird, im Gegensatz zu der langsam fortschreitenden histologischen Veränderung, unmittelbar nach Verschlußbeginn ein rascher initialer Anstieg der GLDH im Serum auf relativ hohe Werte beobachtet.

Diesem folgt ein Abfall innerhalb von ca. drei Tagen auf den "Verschlußpegel". Erst nach verhältnismäßig langer Zeit folgt ein erneuter Anstieg der Enzymaktivitäten, der jetzt mit pathologisch-anatomischen Veränderungen einhergeht. Die schnelle Reaktion der GLDH ist ursächlich schwer zu erklären. Sie wird jedoch mit dem Auftreten disseminierter Einzelzellnekrosen in Zusammenhang gebracht, die durch Drucksteigerung in den Gallenwegen und durch die Einwirkung der rückgestauten Galle entstehen. Bei Tetrachlorkohlenstoffintoxikationen zeigt sich bei Ratten wie auch bei Hunden bereits in den ersten Stunden ein Anstieg der zytoplasmatischen Enzyme, insbesondere der GPT. Nach etwa sechs bis zwölf Stunden folgt der Anstieg der GLDH. Gleichzeitige histologische Untersuchungen bestätigen die in diesem Zeitraum auftretenden Mitochondrienschäden (84).

In der Humanmedizin haben sich für die Differentialdiagnose des Ikterus verschiedene Quotienten eingeführt wie z.B.:

$$\frac{\text{GOT} + \text{GPT}}{\text{GLDH}}$$

Unabhängig von der absoluten Höhe der Enzymaktivitäten im Serum soll das Verhältnis der Transaminasen zu dem der GLDH bei hepatozellulärem Ikterus hoch sein. Im Gegensatz dazu soll eine mechanische Obstruktion, insbesondere eine intrahepatische mechanische Cholestase, zu einem niedrigeren Quotienten führen. Bei der ikterischen Exazerbation der meisten Typen pharmakainduzierter Cholestase liegen die entsprechenden Werte dazwischen.

Tabelle 4: Differentialdiagnose des Ikterus beim Menschen  
anhand des Quotienten  $\frac{\text{GOT} + \text{GPT}}{\text{GLDH}}$  (137)

| $\frac{\text{GOT} + \text{GPT}}{\text{GLDH}}$ |                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| über 50:                                      | Akute Virushepatitis<br>Akute Alkohol-toxische Hepatitis                                                              |
| 20 - 50:                                      | Akute Schübe chronischer Hepatitiden und<br>Zirrhosen, pharmakainduzierte Hepatitis und<br>intrahepatische Cholestase |
| unter 20:                                     | Extrahepatische biliäre Obstruktion<br>Raumfordernde Prozesse in der Leber<br>Chronische destruktive Cholangitis      |

Dieser Quotient wurde von KÖLLMER (132) auch auf den Hund übertragen, wobei sich eine Spannweite von 5 - 120 ergab. Dabei wurden jedoch nur klinisch gesunde Tiere untersucht. Der 90%-Bereich erstreckte sich von 7 - 37,5, was bereits einen Hinweis auf die mangelnde diagnostische Verwertbarkeit dieses Quotienten beim Hund ergibt.

Jedoch lassen sich auch beim Hund aus dem Verhältnis der Transaminasen zu der GLDH Rückschlüsse auf die Nekroserate der Leberzellen ziehen. Bei entzündlichen Lebererkrankungen ist der Anteil der Nekrosen an der allgemeinen Zellschädigung um so größer, je höher die GLDH-Aktivität im Vergleich zu den Transaminasenaktivitäten ist.

Beim Vergleich des GLDH-Verhaltens bei Mensch und Hund ergeben sich aufgrund des sehr ähnlichen Verteilungsmusters in Zellen und Organen keine allzu großen Diskrepanzen.

#### e) Diagnostische Bedeutung

Die Bedeutung der GLDH für die klinische Diagnostik ergibt sich aus der weitgehenden Leberspezifität und dem ausschließlichen Vorkommen in den Mitochondrien. Das Freiwerden des Enzyms erst bei bestehender Leberzellnekrose läßt die GLDH

als Such-Methode in der Routinediagnostik wenig sinnvoll erscheinen. Jedoch wurden an der Münchener Med. Tierklinik mehrfach "isolierte" GLDH-Erhöhungen beobachtet, deren Ursache noch nicht völlig geklärt ist. In Kombination mit anderen Enzymen, wie den Transaminasen und der AP, liefert die GLDH wertvolle Informationen besonders über den Schweregrad akuter Schädigungen (71).

Da die normalen Aktivitäten der GLDH sehr niedrig und individuell recht konstant sind, haben selbst geringfügig erscheinende Erhöhungen eine relativ große diagnostische Aussagekraft (83).

#### 4.3. Bilirubin

##### Bilirubin-Metabolismus

##### 1. Physiologie

##### a) Entstehung des Bilirubins

Bilirubin stammt hauptsächlich aus dem Häm-Anteil des Hämoglobins. Alternde Erythrozyten werden in einer Rate von etwa 1 % täglich im reticuloendothelialen System der Milz, den Kupffer'schen Sternzellen der Leber und im Knochenmark abgebaut, wobei 1 g Hämoglobin 36,2 mg Bilirubin ergibt (142).

Der Abbau anderer Metalloporphyrine und das in der Literatur erwähnte, sogenannte "früh markierte" Bilirubin sind zusätzliche Quellen, die jedoch von geringerer Bedeutung sind. Das letztere besteht aus einer initialen "hepatischen" und einer späteren "erythropoetischen" Komponente (27).

Die Konversion von Häm zu Biliverdin scheint von einem mikrosomalen Enzym, genannt Hämoxigenase, katalysiert zu werden. Dies geht mit einer Freisetzung von Kohlenstoffmonoxyd einher. Auch eine nichtenzymatische Bildung ist möglich (143). Die endogene CO-Produktion ist somit ein Maßstab für den Hämabbau (ca.  $4,4 \pm 0,7$  mg/kg/24h für den Menschen) (144). Biliverdin wird dann von einer Biliverdin-Reduktase im Cytosol zu Bilirubin transformiert.

#### b) Transport im Blut

Die Löslichkeit von Bilirubin in wäßrigen Medien ist extrem niedrig ( $0,1 \mu\text{M}$  in Phosphatpuffer,  $0,1 \text{ M}$  bei  $\text{pH } 7,4$ ) (145). Beim Transport im Blut ist das Bilirubin fest an Serumalbumin gebunden. Für die erste Bindungsstelle wurde eine Dissoziationskonstante von  $7 \times 10^{-9} \text{ M}$  ermittelt. Im Serum eines erwachsenen Menschen scheinen nur  $0,6 - 1,6 \text{ nmol/Liter}$  gebunden zu sein. Bei Neugeborenen werden höhere Werte gefunden (146). Ein Teil des Bilirubins ist auch an Erythrozyten gebunden, besonders wenn die Albuminbindung abnimmt (147).

#### c) Aufnahme in die Leber und intrazellulärer Transport

Bilirubin gelangt in ungebundener Form in den Hepatozyten. Die Aufnahme geschieht sehr schnell, was durch das rasche Verschwinden im Plasma bewiesen wird (148, 149).

In der Parenchymzelle ist das meiste Bilirubin an Cytosolproteine gebunden (150). Zwei hauptsächlich bindende Proteine, Ligandin und Protein Z, zeigen ein relativ unspezifisches Bindungsvermögen gegenüber Bilirubin, BSP, Gallensäuren, Azofarbstoffen, Steroiden etc. Beide Proteine sind am intrazellulären Transport beteiligt (151, 152).

#### d) Konjugation

Die Konjugation einer oder zwei der Propionsäure-Seitenketten des Bilirubins mit Zuckern wird von mikrosomalen Transferasen katalysiert. UDP-Zucker dienen als Donor-Substrate.

#### e) Biliäre Sekretion und Elimination

Die gebildeten Konjugate werden in die Gallencanaliculi sezerniert. Dieser Mechanismus arbeitet getrennt von dem der Gallensäuren (6, 27, 153).

Einige Gallensäuren, wie die früher erwähnte Taurocholsäure, steigern jedoch den Gallefluß und erhöhen offensichtlich die maximale Transportkapazität von Bilirubin bei Ratte und Hund (154). Wie bei den Gallensäuren scheint auch beim Bilirubin die biliäre Sekretion der limitierende Schritt für die "Sät-

tigung" der Galle mit Bilirubin zu sein. Dieser Schritt ist sehr "fragil".

Die Bilirubin-Konjugate unterliegen weiteren reduzierenden Umwandlungen durch die intestinale Flora zu Urobilinogenen. Diese werden durch die Faeces eliminiert oder reabsorbiert und durch Leber oder Niere wieder ausgeschieden (155).

Eine Übersicht über die Physiologie des Bilirubins und deren Beeinträchtigung gibt Tabelle 5 (142).

Tabelle 5

| Physiologie                                                                       | Störungen                                                                                                                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Produktion:</b>                                                                |                                                                                                                                              |
| 1. Zerfall von Ery-Hb                                                             | Hämolyse                                                                                                                                     |
| 2. Abbau von Myoglobin<br>Catalase<br>Cytochromen                                 | Pharmaka (Phenobarbital)                                                                                                                     |
| 3. "frühmarkiertes" Bilirubin<br>Häm-Synthese i.d. Leber<br>Medullärer Häm-Umsatz | Pharmaka ? Hunger ?<br>Ineffektive Erythropoese                                                                                              |
| <b>Transport:</b>                                                                 |                                                                                                                                              |
| Bilirubin - Serumalbumin<br>- an Ery's gebunden                                   | Vermindertes Albumin<br>Verminderte Bindung (Neugeb. Acidose)<br>Kompetitive Bindung (Sulfonamide<br>Salicylate)                             |
| <b>Aufnahme durch die Leber:</b>                                                  |                                                                                                                                              |
| Membran - Transit<br>Intrazell. Carrier                                           | Neugeborene: niedrige Ligandin-<br>konzentration<br>Durch Fasten induz. Abnahme                                                              |
| <b>Konjugation:</b>                                                               |                                                                                                                                              |
| Im endoplasm. Reticulum                                                           | Hemmung durch Pharmaka<br>(Novobiocin, Chloramphenicol)<br>Geschlechtshormone<br>Gunn-Ratte                                                  |
| <b>Sekretion:</b>                                                                 |                                                                                                                                              |
| In den Gallencanaliculus                                                          | Pharmakainduz. Cholestase<br>Hepatitis, Zirrhose, Corriedale-Schaf etc.                                                                      |
| <b>Elimination:</b>                                                               |                                                                                                                                              |
| Bakterieller Abbau<br>‡ Enterohepat. Kreislauf                                    | Mechanische Obstruktion<br>Dekonjugation durch Darm- $\beta$ -<br>Glucuronidase ohne bakt. Abbau:<br>- Neugeborene<br>- Antibiotika Therapie |

## 2. Pathophysiologie

Der Bilirubinstoffwechsel kann auf verschiedenen Ebenen gestört sein.

Je nach Bezugsgröße kann pathologisch-anatomisch zwischen prä-mikrosomalem = prähepatischem Ikterus, mikrosomalem = hepatischem und postmikrosomalem = posthepatischem Ikterus unterschieden werden.

### Prähepatischer Ikterus:

Dieser entsteht, wenn die natürliche Konjugationskapazität der Leber, die normal ein mehrfaches des physiologischen Bilirubinangebotes beträgt, überlastet wird. Dies tritt bevorzugt bei Hämolyse auf und kommt im Serum durch erhöhte Mengen unkonjugierten = primären Bilirubins zum Ausdruck (12).

### Hepatischer Ikterus:

Hier ist die Leberzelle selbst betroffen. Gemäß dem natürlichen Weg des Bilirubins sind Störungen an drei verschiedenen Stellen möglich (75).

- a) bei der Aufnahme des noch unkonjugierten Bilirubins aus dem zirkulierenden Blut in die Leberzelle;
- b) bei der Glucuronidierung des Bilirubins I im endoplasmatischen Reticulum des Hepatozyten;
- c) bei der Sekretion über die canaliculäre Membran in den Gallencanaliculus.

### Posthepatischer Ikterus:

Das auslösende Agens liegt hier im Bereich der galleabführenden Wege. Die Leberzelle selbst ist primär nicht geschädigt. Das von ihr gebildete konjugierte Bilirubin kann nicht abfließen und tritt ins Blut über, wo es z.T. wieder dekonjugiert wird. Kommt es durch den Gallestau sekundär auch zur Schädigung der Leberzelle, werden die reinen "Verschlußsymptome" durch die Lebererkrankung überlagert (27).

### 3. Bilirubin bei intrahepatischer Cholestase

Die intrahepatische Cholestase entspricht dem hepatischen Ikterus. Ursächlich liegt ihr eine Membranschädigung des Hepatozyten auf canaliculärer Seite zugrunde. Dies führt zu einer Störung der Sekretion gallepflichtiger Substanzen und somit auch des konjugierten Bilirubins in den Canaliculus.

Dieses konjugierte Bilirubin tritt schließlich durch die geschädigten Membranen ins Blut über, wo es ebenfalls teilweise intravasal dekonjugiert wird. Das erklärt den Anstieg des konjugierten sowie einen Teil des unkonjugierten Bilirubins im Serum bei intra- und extrahepatischer Cholestase. Doch gibt es für das unkonjugierte Bilirubin noch andere Quellen. Konjugiertes Bilirubin kann auch in der Leberzelle durch lysosomale Hydrolyse dekonjugiert werden und in den Blutkreislauf reurgitiert werden (142, 156).

Ein weiterer Teil ist physiologischen Ursprungs. Durch die Sekretionsstörung wird im Hepatozyten die Konjugation sowie die Aufnahme des sinusoidal anflutenden, unkonjugierten Bilirubins aus dem Häm-Abbau verzögert (27).

Somit liegt bei intrahepatischer Cholestase sowohl ein Anstieg des primären, wie auch des sekundären Bilirubins vor.

### 4. Pathologische Eigenschaften des unkonjugierten Bilirubins

Kommt es im Verlauf einer Cholestase zu hohen Konzentrationen primären Bilirubins, so entwickelt dieses per se toxische Eigenschaften, die denen der Gallensäuren entsprechen.

So zeigte sich bei in vitro-Versuchen, daß freies Bilirubin die mitochondriale Atmung hemmt. Es senkt die Sauerstoffaufnahme mit Minderung NAD-abhängiger Substrate. Die oxidative Phosphorylierung wird entkoppelt. Dabei läßt sich morphologisch eine Schwellung der Mitochondrien erkennen (9, 27).

Dies korreliert auch mit elektronenmikroskopischen Beobachtungen an Mitochondrien aus Lebern von Menschen mit extrahepatischer Obstruktion des Gallengangs.

Des weiteren ist freies Bilirubin nicht polar und relativ unlöslich in alkalischer Galle. Es kann zur Präzipitation mit biliären Glycoproteinen und zur Bildung von Calculi kommen (70). Verschiedene Fälle von Cholangiolithiasis wurden außer beim Menschen auch bei Haussäugetieren (Hund, Rind, Pferd) beschrieben (70).

#### 5.) Besonderheiten des Bilirubinstoffwechsels beim Hund

Nach den eingehenden Untersuchungen von EIKMEIER (157) konnte beim Hund "keine auch nur einigermaßen feststehende Nierenschwelle für Bilirubin gefunden werden. Bilirubinurie kann bei jedem nur möglichen Serumbilirubinwert vorkommen."

So scheiden etwa 20 % aller gesunden Hunde Bilirubin mit dem Harn aus (158).

Fieberzustände und Hunger können ebenfalls zur Bilirubinurie führen. Umgekehrt fehlt die Bilirubinurie gelegentlich bei pathologischen Serumbilirubinwerten (128). Diese Angaben beziehen sich hauptsächlich auf das glucuronidierte Bilirubin. Jedoch weisen einige Untersuchungen darauf hin, daß beim Hund auch das primäre Bilirubin harnfähig ist (157). Des weiteren wurde an hepatektomierten Hunden festgestellt, daß diese Spezies primäres Bilirubin auch in der Niere konjugieren kann (70, 142). Auch bezüglich der Konjugate in der Galle stellt der Hund eine Besonderheit dar: Mit 83 % Di-Konjugaten zu 17 % Mono-Konjugaten rangiert er vor der Katze (77 %), dem Menschen (73 %), der Ratte (61 %) und dem Kaninchen (16 %). Die meisten anderen Tierspezies sezernieren fast ausschließlich Mono-Konjugate in die Galle.

Referenzbereich: Für den Hund ergibt sich aus der Literatur ein Grenzwert der Serumbilirubinkonzentration von 0,25 - 0,30 mg/dl (83) bzw. bis 0,2 (0,4) mg/dl (75).

Die Nieren des Hundes können, normale Funktionsfähigkeit vorausgesetzt, beträchtliche Mengen Bilirubin ausscheiden, so daß es eines erheblichen Anfalls von Gallenfarbstoffen bedarf, ehe es zu einer Hyperbilirubinämie kommt (83).

Hieraus ergibt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen einer Hyperbilirubinämie und einer Nierenschädigung (128). LETTOW (83) stellt jedoch fest:

- 1.) Eine Nierenfunktionsstörung allein bewirkt niemals eine Hyperbilirubinämie. Kommt es bei einer Azotämie zur Erhöhung des Serumbilirubinspiegels, muß auch die Leber erkrankt sein.
- 2.) Liegen Leber- und Nierenfunktionsstörung gleichzeitig vor, dann ist die Serumbilirubinkonzentration in starkem Maße auch von dem Grad der Niereninsuffizienz abhängig. In solchen Fällen kann man beim Hund extrem hohe Bilirubinwerte im Serum antreffen.
- 3.) Hohe Bilirubinkonzentrationen bei intakter Nierenfunktion weisen auf einen akuten, schweren Leberschaden hin.

Wegen der geringen Nierenschwelle sollen deshalb bereits leichte Erhöhungen des Serumbilirubins ein guter Indikator für Leberzellerkrankungen sein (70). So schreibt EIKMEIER (157): "Werte für Gesamtbilirubin über 0,40 mg/dl weisen eindeutig auf einen Leberschaden hin, Werte zwischen 0,20 und 0,40 mg/dl sind verdächtig und müssen kontrolliert werden".

Leider ist die Hyperbilirubinämie nicht regelmäßig Symptom jeder Lebererkrankung. Bei Untersuchungen stellte sich heraus, daß bei 19 % aller leberkranken Hunde der Serumbilirubinwert im physiologischen Bereich lag (70).

Unterschiedliche Reaktionen des Serumbilirubins ergaben sich bei Tetrachlorkohlenstoffintoxikation und experimenteller extrahepatischer Gallengangsligatur. Zeigte das Bilirubin bei  $\text{CCl}_4$ -Intoxikation keine signifikante Veränderung, so ergaben sich nach Gallengangsligatur hohe Werte (5 - 6 mg/dl), wobei der Anstieg bereits am ersten bis zweiten Tag nach Obstruktion stark ausgeprägt war. Das Maximum wurde am 5. bis 6. Tag ermittelt. Danach sanken die Werte bis über die Zwei-Wochen-Grenze hinaus langsam ab (84).

Sehr hohe Serumbilirubinkonzentrationen treten bevorzugt bei extra- oder intrahepatischer Cholestase auf, während die mei-

sten hepatozellulären Erkrankungen mit Werten kleiner 4,0 mg/dl einhergehen sollen (96).

Vergleichbare Erkrankungen des Menschen würden zu wesentlich höheren Bilirubinanstiegen führen.

#### Klinische Anzeichen des Ikterus:

Beim Menschen treten klinische Anzeichen des Ikterus dann auf, wenn der Bilirubingehalt im Serum den Wert von 2,0 mg/dl übersteigt (157). Beim Hund liegt dieser Grenzwert höher. Bei mehreren Hunden wurden über eine Woche lang Serumbilirubinwerte um 2,0 mg/dl gefunden, ohne daß auch nur Spuren eines Ikterus nachweisbar waren. Ein Ikterus trat regelmäßig auf, wenn Bilirubinwerte über 3,0 mg/dl mehrere Tage vorhanden waren. Bei nur kurzfristig erhöhtem Bilirubinspiegel kann dieser Grenzwert sogar überschritten werden, ohne daß es zu einem Ikterus kommt (157).

Diese Angaben stimmen gut mit den Ergebnissen im vorher beschriebenen Gallengangsligaturversuch (84) überein. Hier zeigten die Hunde erst ab dem dritten Tag klinische Anzeichen eines Ikterus. Dieser Zeitpunkt korreliert mit dem Erreichen des 3 mg/dl-Grenzwertes.

#### Diagnostische Bedeutung:

Aus den Darstellungen ergibt sich, daß die Interpretation des Bilirubinspiegels dadurch kompliziert wird, daß Konzentrationserhöhungen aufgrund der niedrigen Nierenschwelle für konjugiertes Bilirubin nicht im Serum erscheinen. Liegen jedoch Werte über 0,40 mg/dl vor, so kann mit großer Sicherheit auf einen Leberschaden geschlossen werden (157). Extrem hohe Konzentrationen kommen bei extra- und intrahepatischer Cholestase vor, müssen aber differentialdiagnostisch von einer zusätzlich an der Lebererkrankung beteiligten Nierenschädigung abgegrenzt werden (70, 83).

### III. Eigene Untersuchungen

#### 1. Material und Methoden

##### 1.1. Tiermaterial

Die Untersuchungen wurden an klinikeigenen Hunden der I.Medizinischen Tierklinik der Universität München durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in drei verschiedene Gruppen unterteilt:

Gruppe I : 5 Rottweilermischlinge  
Geschlecht: 4 männliche Tiere, 1 weibliches Tier  
Alter: älter als 4 Jahre  
Gewicht: zwischen 18 kg und 30 kg  
Diese Tiere befinden sich bereits seit Jahren im Besitz der Klinik. Sie dienten dort sporadisch als Blutspender.

Gruppe II : 4 Schäferhundmischlinge  
Geschlecht: 4 männliche Tiere  
Alter: älter als 4 Jahre  
Gewicht: zwischen 18 kg und 30 kg  
Diese Tiere wurden im Verlauf der Untersuchungen von der Klinik zugekauft.

Gruppe III : 6 Beagles  
Geschlecht: 6 männliche Tiere  
Alter: ca. 1 Jahr  
Gewicht: zwischen 9,5 kg und 12 kg  
Diese Tiere wurden neu zugekauft und nach einer mindestens 4wöchigen Eingewöhnungsperiode zu den Versuchen herangezogen.

##### 1.1.1. Haltung und Fütterung

Die Hunde waren in einer separaten Abteilung der I.Medizinischen Tierklinik in Boxen untergebracht und hatten zweimal täglich die Möglichkeit zum Auslauf.

Die Fütterung bestand aus handelsüblichem Dosenfutter gemischt mit Reis und gekochtem Rindfleisch und wurde einmal täglich zur gleichen Tageszeit in konstanter Menge angeboten. Wasser stand den Hunden ad libitum zur Verfügung.

Sämtliche Hunde wurden routinemäßig geimpft, entwurmt und regelmäßig einer klinischen Untersuchung sowie einer Gewichtskontrolle unterzogen.

Vor Beginn eines Experimentes wurde jeder einzelne Hund über mindestens drei Tage zusätzlich labordiagnostisch untersucht, wobei sich in keinem Fall Anzeichen einer Erkrankung, speziell eines Leberschadens, ergaben.

#### 1.1.2. Blutentnahme

Die venöse Blutentnahme erfolgte während der gesamten Untersuchung in zwei Phasen:

1. Phase: In den ersten Experimenten (bis incl. 80 mg LC/kg KG) erfolgte die Blutentnahme im 12-Stunden-Abstand, jeweils um 8.30 Uhr und um 20.30 Uhr.

2. Phase: Nachdem dadurch diurnale Schwankungen weitgehend ausgeschlossen werden konnten, wurde im folgenden auf die abendliche Kontrolle verzichtet und die Probennahme täglich um 8.30 Uhr durchgeführt. Die entnommene Blutmenge betrug für das gesamte Versuchsprogramm jeweils etwa 10 ml. Nach Abwarten der Koagulation (ca. 15-30 min.) und zehnminütigem Zentrifugieren bei 3000 U/min. wurde von dieser Blutmenge das Serum gewonnen.

#### 1.1.3. Medikation

Bevor mit dem eigentlichen Experiment begonnen wurde, durchliefen die Hunde einen jeweils mindestens dreitägigen "Leerversuch", der zur Ermittlung der individuellen Enzym-Basisaktivitäten bzw. des Bilirubinspiegels diente.

Nach Abschluß dieses Vorlaufes begann die Medikation mit Li-

thocholsäure, die je nach Dosierung und Körpergewicht des Hundes in Gelatinekapseln abgewogen wurde. Diese Kapseln wurden unmittelbar nach der Blutentnahme um 8.30 Uhr per os eingegeben.

Bei den Versuchen mit Clanobutin wurde die vom Hersteller empfohlene Dosis von 20 mg/kg KG auf zwei Dosen à 10 mg/kg KG verteilt und in 12stündigem Abstand verabreicht. Dabei erfolgte die morgendliche Gabe gleichzeitig mit der der Lithocholsäure.

## 1.2. Versuchsaufbau

### 1.2.1. Vorversuche bis zu ersten cholestatischen Reaktionen

Ziel: Ermittlung einer cholestatisch wirksamen Lithocholatkonzentration. Dabei sollte die Wirkung steigender Dosierungen von Lithocholsäure (LC) auf die Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin im Serum untersucht werden.

|                 |                |
|-----------------|----------------|
| Geprüft wurden: | 10 mg LC/kg KG |
|                 | 20 "           |
|                 | 40 "           |
|                 | 100 "          |
|                 | 120 "          |
|                 | 160 "          |

Der Behandlungszeitraum lag jeweils zwischen 5 und 9 Tagen.

### 1.2.2. Versuche mit 160 mg LC/kg KG

Nachdem sich bei der Dosierung von 160 mg LC/kg KG ein eindeutig cholestatischer Effekt ergab, wurden zwei neue Versuchsreihen begonnen.

Verlaufskontrolle nach Absetzen der LC auf cholestatischem Niveau:

Zwei Hunden der Gruppe I wurden 160 mg LC/kg KG über 10 Tage verabreicht. Das Verhalten der Enzyme AP, GGT, GLDH und des Bilirubins wurde bis zum 32. Tag nach Absetzen der LC verfolgt. Die Kontrolle erfolgte in eintägigen, ab dem 17. Tag des Versuchs in zweitägigen Abständen.

Verlaufskontrolle unter Dauerapplikation von LC:

Unter dem Aspekt der chronischen LC-Gabe wurde bei zwei Hunden der Gruppe I die Dosis von 160 mg LC/kg KG erst am 25.Tag abgesetzt und die Werte der Parameter täglich bestimmt.

Erweiterung des Versuchsprogramms bei 160 mgLC/kg KG:

Die als cholestatisch wirksam angenommene Dosis von 160 mg LC/kg KG sollte an den vier Hunden der Gruppe II weiter untersucht werden und gegebenenfalls erste Therapieversuche unternommen werden. Die Ergebnisse bedingten jedoch einen Versuchsablauf, der nach 26tägiger Fütterung von 160 mg LC/kg KG abgebrochen wurde. Bis auf eine Ausnahme zeigte keiner der vier im Versuch eingesetzten Hunde eine cholestatische Reaktion auf die angewandte LC-Dosierung.

Dadurch wurden weitere Dosissteigerungen erforderlich.

### 1.2.3. Versuche mit weiteren Dosissteigerungen

Um Uneinheitlichkeiten des Tiermaterials zu verringern, wurden in den folgenden Versuchen ausschließlich gleichaltrige, reinrassige Beaglehunde der Gruppe III verwendet.

240 mg LC/kg KG

Die nächst höhere Dosierungsstufe wurde mit 240 mg LC/kg KG festgelegt. Ihre Wirkung wurde bei drei Hunden der Gruppe III über 15 Tage verfolgt.

400 mg LC/kg KG

Bei einer erneut für erforderlich gehaltenen Dosiserhöhung wurden 400 mg LC/kg KG appliziert. Der Versuchsaufbau mit den drei anderen Beaglerüden der Gruppe III entsprach mit einer Applikations- und Meßdauer von 15 Tagen dem Vorversuch.

1000 mg LC/kg KG

Auch die Resultate des vorhergehenden Versuchs führten zu keiner einheitlichen Cholestase. Deshalb wurden in diesem Versuch die Wirkungen von 1000 mg LC/kg KG untersucht.

Die drei für dieses Experiment verwendeten Hunde der Gruppe III reagierten auf diese Dosis mit der Ausbildung einer deutlichen Cholestase. Der Dosierungszeitraum betrug in einem Fall 15 Tage, in den beiden anderen Fällen je 20 Tage. Der Meßzeitraum wurde gemäß den beiden vorherigen Versuchsreihen auf ebenfalls 15 Tage vereinheitlicht.

#### 1.2.4. Therapieversuch

1000 mg LC/kg KG + 20 mg Clanobutin/kg KG

Die Ergebnisse der Vorversuche ließen es sinnvoll erscheinen, den Therapieversuch mit 20 mg Clanobutin/kg KG ebenfalls auf der Dosis von 1000 mg LC/kg KG basieren zu lassen.

Bei drei Beagles der Gruppe III wurden nach Erreichen eines cholestatischen Pegels ab dem 6. Tag der LC-Medikation zusätzlich 20 mg Clanobutin/kg KG angewandt. Die Wirkung auf die Untersuchungskriterien während der LC-Cholestase wurde bei täglicher Kontrolle über 15 Tage beobachtet. Somit ergab sich ein Gesamt-Meßzeitraum von 20 Tagen.

#### 1.3. Reagenzien und Pharmaka

|                                                       |                                                     |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Substanzen:                                           | Bezugsquelle:                                       |
| Lichocholsäure (Na-Salz)                              | Fa. Sigma                                           |
| Clanobutin                                            | Fa. Byk Gulden                                      |
| [4,4-chlor-N-(4-methoxyphenyl)-benzamido-Buttersäure] |                                                     |
| Gelatinekapseln                                       | Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte (WdT) |

Die Enzym- und Substratbestimmungen wurden ausschließlich mit Testkombinationen der Fa. Boehringer, Mannheim, durchgeführt.

#### 1.4. Enzymbestimmungen

##### 1.4.1. Geräte:

- Eppendorf Filterphotometer mit Quecksilberdampfampe und automatischem Küvettenwechsler und angeschlossenem
- Rechner (Fa. Vogel) mit Digitalanzeiger und Drucker, der nach Eingabe der jeweiligen Faktoren die Extinktionsdifferenzen in IU/l ausdruckt.
- Durchlaufthermostat
- Quarzglasküvetten (1 cm Schichtdicke)
- Kolbenhubpipetten (Eppendorf) 20, 50, 100, 200, 500 und 1000  $\mu$ l

##### 1.4.2. Probenmaterial

Als Probenmaterial für die photometrische Bestimmung diente Nüchternserum, das entweder am gleichen oder maximal zwei Tage nach Lagerung bei +4°C untersucht wurde.

Hämolytische Seren wurden verworfen. Lipämische Seren wurden mit dem Hilfsreagenz Frigen (Fa. Schubert) geklärt.

##### 1.4.2.1. Serumverdünnungen

Bei höheren Enzymaktivitäten wurden, falls notwendig, Verdünnungsstufen von 1 : 5, 1 : 11 und 1 : 121 gewählt, die mit physiologischer Kochsalzlösung unmittelbar vor der Messung hergestellt wurden. Die Ergebnisse wurden dann mit den jeweiligen Faktoren multipliziert.

##### 1.4.2.2. Qualitätskontrollen

Für jede Serumprobe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und daraus der Mittelwert berechnet.

Eine zusätzliche qualitative Überprüfung erfolgte über den Einsatz eines Kontrollserums (Precinorm U<sup>R</sup>, Fa. Boehringer, Mannheim), das jede Meßreihe mit maximal fünf Proben begleitete. Die Resultate des Kontrollserums lagen immer im Vertrauensbereich.

### 1.4.3. Alkalische Phosphatase (AP)

Test-Kombination: "Monotest Alkalische Phosphatase optimiert"

Methode: "Optimierte Standard-Methode" der Gesellschaft für Klinische Chemie.

Das Testprinzip beruht auf der Reaktion:



Dabei wird p-Nitrophenylphosphat durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Die pro Zeiteinheit freigesetzte p-Nitrophenol-Menge ist proportional der AP-Aktivität. p-Nitrophenol kann aufgrund seiner gelben Farbe bei Hg 405 nm gemessen werden.

Reagenzien:

|                                         | Endkonzentration<br>im Test |
|-----------------------------------------|-----------------------------|
| Puffer : Diäthanolamin-Puffer           | 1,0 mol/l pH 9,8            |
| MgCl <sub>2</sub>                       | 0,5 mmol/l                  |
| Substrat: Natrium-p-Nitrophenylphosphat | 10,0 mmol/l                 |

Meßvorgang:

- Ansetzen der Reagenzien nach Angabe des Herstellers
- Serum und Reagenzlösung langsam auf 25°C temperieren
- 1000 µl Reagenzlösung und 20 µl Serum in die Meßküvette füllen
- 30 Sekunden mischen
- Erste Extinktionsmessung nach 30 Sekunden, dann jede weitere Minute (3 Extinktionsdifferenzen)

Filter: Hg 405 nm

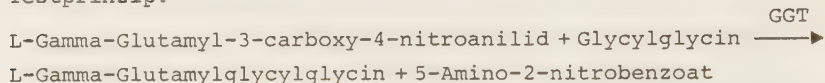
Die ermittelte Extinktionsdifferenz wird mit dem Faktor 2757 multipliziert.

#### 1.4.4. Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT)

Testkombination: "Monotest GGT neu"

Methode: Kinetische Methode nach PERSIJN und SZASZ

Testprinzip:



Die Menge des freigesetzten 5-Amino-2-nitrobenzoats ist der GGT-Aktivität proportional. Die aufgrund seiner gelben Farbe verursachte Extinktionszunahme wird photometrisch bei Hg 405 nm gemessen.

Reagenzien:

Endkonzentration  
im Test

|                                  |                                          |                    |
|----------------------------------|------------------------------------------|--------------------|
| Puffer:                          | Trispuffer                               | 100 mmol/l pH 8,25 |
| Substrat:                        | L-Gamma-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid | 2,9 mmol/l         |
| Gamma-Glutamyl-<br>Restacceptor: | Glycylglycin                             | 100 mmol/l         |

Meßvorgang:

- Ansetzen der Reagenzien nach Angabe des Herstellers
- Serum und Reagenzien langsam auf 25°C temperieren
- 500 µl Reagenzlösung und 50 µl Serum in die Meßküvette füllen
- 30 Sekunden mischen
- Erste Extinktionsmessung nach 30 Sekunden, dann in 1minütigem Abstand drei weitere Messungen.

Filter: Hg 405 nm

Die ermittelte Extinktionsdifferenz wird mit dem Faktor 1158 multipliziert.

#### 1.4.5. Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

Testkombination: "Monotest GLDH aktiviert"

Methode: "Optimierte Standard-Methode" der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

Testprinzip:



Die Oxidation von NADH ist dem Substratumsatz direkt proportional, und seine Abnahme dient als Meßgröße, wobei NADH aufgrund seiner Absorption bei Hg 366 nm, Hg 334 nm oder Hg 340 nm gut zu bestimmen ist. Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt weit auf der Seite von Glutamat.

| Reagenzien:            | Endkonzentration<br>im Test |
|------------------------|-----------------------------|
| Coenzym                |                             |
| NADH                   | 0,2 mmol/l                  |
| Adjuvans LDH*          | 2 IU/ml                     |
| Aktivator ADP**        | 1 mmol/l                    |
| Substrate:             |                             |
| $\alpha$ -Ketoglutarat | 5,3 mmol/l                  |
| Ammoniumacetat         | 100 mmol/l                  |
| Puffer:                |                             |
| Triäthanolamin-Puffer  | 50 mmol/l pH 8,0            |
| EDTA                   | 2,5 mmol/l                  |

\* Die Zugabe von LDH während der Inkubationsperiode dient zur Entfernung von Pyruvat, das in einer unspezifischen Vorreaktion entsteht.

\*\* ADP (1 mmol/l) erhöht die GLDH-Aktivität um das  $1,86 (\pm 0,51)$ -fache.

#### Meßvorgang:

- Ansetzen der Reagenzien nach Angabe des Herstellers
- Serum und Reagenzlösung langsam auf 25°C temperieren
- 500  $\mu$ l Reagenzlösung und 100  $\mu$ l Serum in die Meßküvette füllen
- 30 Sekunden mischen
- Erste Extinktionsmessung nach 3 Minuten Inkubation bei 25°C
- Zweite Extinktionsmessung nach 5 Minuten (1 Extinktionsdifferenz)

Filter: Hg 334 nm

Die ermittelte Extinktionsdifferenz wird mit dem Faktor 353 multipliziert.

### 1.5. Substratbestimmung: Gesamtbilirubin

Zur Messung des Bilirubins wurde ebenfalls die Testkombination der Fa. Boehringer, Mannheim, verwendet.

#### 1.5.1. Geräte

Es wurden die gleichen Geräte wie bei den Enzymbestimmungen verwendet.

#### 1.5.2. Probenmaterial

Zur Bilirubinbestimmung wurde nur frisch gewonnenes, hämolyse-freies Serum verwendet. Auf Schutz vor Licht- und Sonneneinwirkung wurde geachtet.

##### 1.5.2.1. Qualitätskontrolle

Auch hier wurden Doppelbestimmungen und eine zusätzliche qualitative Prüfung über ein Kontrollserum (Precinorm U<sup>R</sup>) durchgeführt.

#### 1.5.3. Methodik der Bilirubinbestimmung

Testkombination: Bilirubin

Methode: Die Methode lehnt sich an das bereits 1938 von JENDRASSIK-GROF entwickelte Verfahren an.

Dabei wird das Gesamtbilirubin in Gegenwart von Coffein mit diazotierter Sulfanilsäure zu Azobilirubin gekoppelt, dessen Farbintensität proportional der Bilirubinkonzentration ist und nach Zugabe von Tartrat-Lösung bei Hg 578 nm gemessen wird.

Reagenzien:

Konzentration der  
Lösung

Sulfanilsäure  
in HCl

29 mmol/l  
0,17 N

Natriumnitrit

25 mmol/l

Coffein  
in Natriumbenzoat

0,26 mmol/l  
0,52 mol/l

Tartrat  
in NaOH

0,93 mol/l  
1,9 N

### Meßvorgang:

Die vier Reagenzlösungen sind vom Hersteller bereits gebrauchsfertig abgepackt. Die Proben werden gegen ihren Leerwert (Probenleerwert) gemessen, der gleichzeitig angesetzt werden muß.

### Einpipettieren in Reagenzgläser:

|                          | Probenleerwert | Probe     |
|--------------------------|----------------|-----------|
| Sulfanilsäure-<br>lösung | 0,20 ml        | 0,20 ml   |
| Natriumnitrit-<br>lösung | -              | 1 Tropfen |
| Coffein-<br>Lösung       | 1,00 ml        | 1,00 ml   |
| Probe                    | 0,20 ml        | 0,20 ml   |

mischen, zwischen 10 und 60 Minuten bei 20 - 25°C stehen lassen.

|                |         |         |
|----------------|---------|---------|
| Tartrat-Lösung | 1,00 ml | 1,00 ml |
|----------------|---------|---------|

mischen, 5 - 30 Minuten bei 20 - 25°C stehen lassen.

Extinktion der Probe gegen Probenleerwert messen.

Filter: Hg 578 nm

Die ermittelte Extinktionsdifferenz wird mit dem Faktor 10,8 multipliziert.

#### IV. Ergebnisse

##### 1. Ermittlung einer cholestatisch-wirksamen Lithocholsäuredosis für den Hund:

Einen Überblick über die Veränderungen der einzelnen Parameter geben die Abb. 5 bis 8. Die entsprechenden Säulen repräsentieren den Durchschnittswert der Enzymaktivitäten bzw. der Bilirubinkonzentration. Dieser Wert wurde aus der Anzahl der an dem jeweiligen Experiment beteiligten Hunde und den Tagesergebnissen des gesamten Versuchszeitraumes ermittelt.

Über eine genaue Dosierung der LC beim Hund liegen in der Literatur noch keine Angaben vor.

##### 1.1. Dosierungen ohne cholestatischen Effekt (10, 20, 40, 80, 100, 120 mg LC/kg KG)

Aufgrund der großen Dosisunterschiede anderer, bereits untersuchter Tierspezies, offensichtlich bedingt durch verschiedene Metabolisierungsschritte (s. S.17), wurde zunächst mit einer relativ geringen Dosis von 10 mg LC/kg KG begonnen.

Über einen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen zeigte bei 12-stündiger Kontrolle keiner der ermittelten Parameter (AP, GLDH, GGT, Gesamtbilirubin) eine von der Norm abweichende Veränderung.

Auch die in weiteren Untersuchungen (159, 160) ermittelten Parameter, insbesondere die Gallensäuren, erreichten keine abnormen Werte. Die stufenweise Verdopplung der Lithocholsäuremenge auf 20 mg/kg KG, 40 mg/kg KG und 80 mg/kg KG erbrachte das gleiche negative Ergebnis in Beobachtungszeiträumen zwischen 5 und 9 Tagen bei gleichem 12-Stunden-Intervall.

Ebenso verlief die jeweils 5- bzw. 9tägige, im 24-Stunden-Abstand durchgeführte Kontrolle bei 100 und 120 mg LC/kg KG.

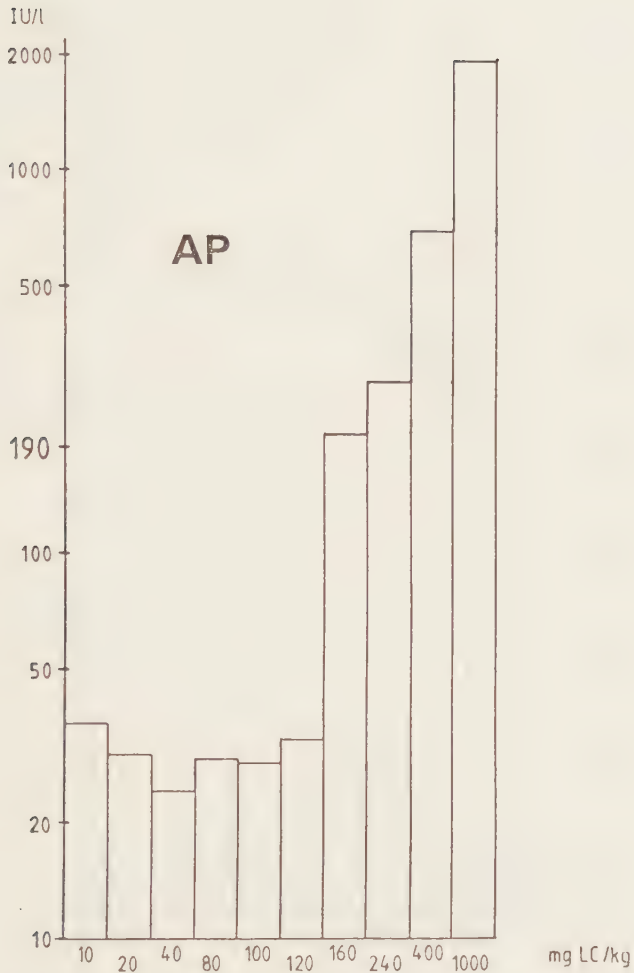


Abb. 5: Durchschnittliche Reaktion der AP auf steigende Lithocholsäure-Dosierungen. Die als physiologisch angesehene Aktivität von bis zu 190 IU/l ist entsprechend markiert.

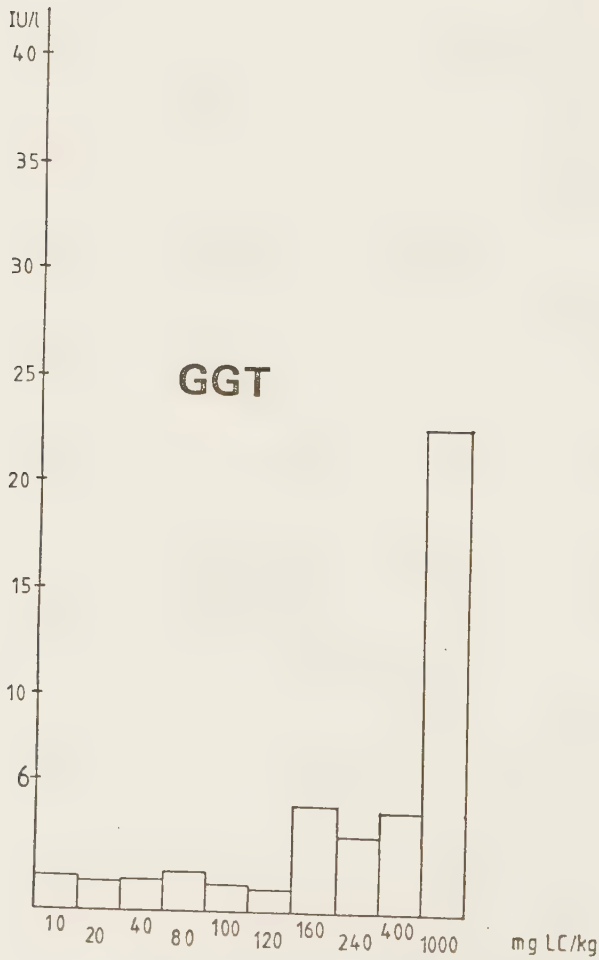


Abb. 6: Durchschnittliche Reaktion der GGT auf steigende Lithocholsäure-Dosierungen. Die als physiologisch angesehene Aktivität von bis zu 6 IU/l ist entsprechend markiert.

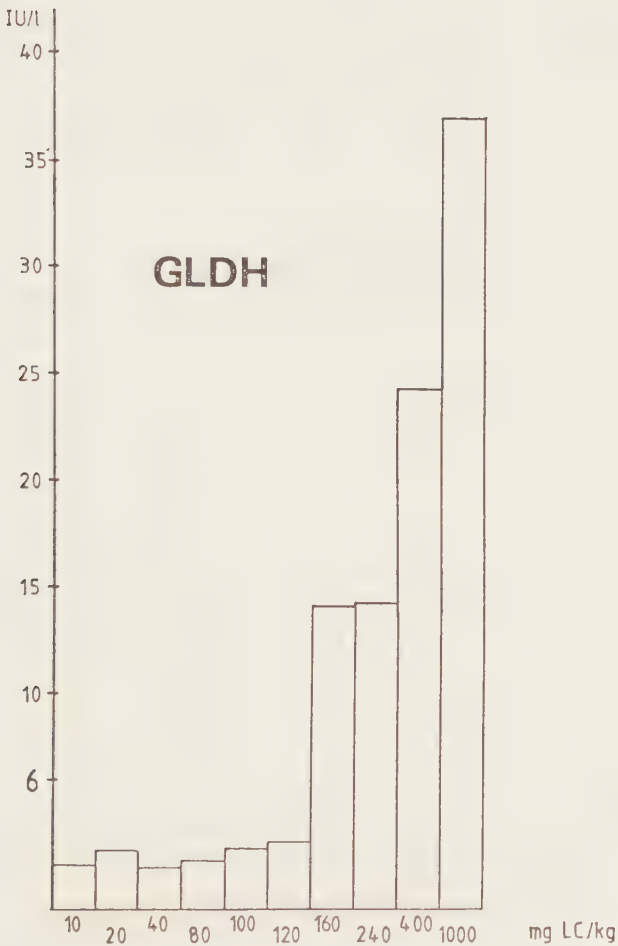


Abb. 7: Durchschnittliche Reaktion der GLDH auf steigende Lithocholsäure-Dosierungen. Die als physiologisch angesehene Aktivität von bis zu 6 IU/l ist entsprechend markiert.



Abb. 8: Durchschnittliche Reaktion des Bilirubins auf steigende Lithocholsäure-Dosierungen. Die als physiologisch angesehene Konzentration von bis zu 0,3 mg/dl ist entsprechend markiert.

## 1.2. Erste Reaktion bei 160 mg LC/kg KG

Im Rahmen der Vorversuche zur Dosisfindung (1.2.1. Material und Methoden) stellte sich bei 160 mg LC/kg KG eine erste Erhöhung der Untersuchungsparameter ein. Dabei ergaben sich folgende Reaktionen (Tab. 6 - Vorversuch 1 Hund der Gruppe I):

Tabelle 6:

### P A R A M E T E R

| Verlauf | AP  | GGT | GLDH | Bilirubin |
|---------|-----|-----|------|-----------|
| 1. Tag  | -   | -   | -    | -         |
| 2. Tag  | -   | -   | +    | -         |
| 3. Tag  | +   | -   | +++  | -         |
| 4. Tag  | ++  | +   | +++  | -         |
| 5. Tag  | +++ | +   | +++  | -         |

- keine Reaktion

+ geringgradige Reaktion, < 3fache Erhöhung der Ausgangsaktivität

++ mittelgradige Reaktion, > 3 <5fache " " "

+++ hochgradige Reaktion, > 5fache Erhöhung der Ausgangsaktivität

### 1.2.1. Überprüfung des Vorversuches mit 160 mg LC/kg KG

Die als cholestatisch wirksame Dosis von 160 mg LC/kg KG sollte nun an weiteren Hunden überprüft werden. Aus deren durchwegs positiven Reaktionen ergaben sich zwei neue Versuchsserien:

#### 1.2.1.1. Verlaufskontrolle nach Absetzen der LC auf cholestatischem Niveau

Bei der Applikation von 160 mg LC/kg KG bis zum 10.Tag und anschließender Kontrolle der Parameter bis zum 32. Tag nach Absetzen der LC zeichnete sich bei den beiden Hunden folgender Verlauf ab (Tab. 7).

Bei anfänglich täglicher Kontrolle wurden ab dem 17.Tag des Versuchs die Meßintervalle auf zwei Tage verlängert, da die Veränderungen nur gering waren und den Hunden die tägliche Blutentnahme erspart bleiben sollte.

Tab. 7: Übersicht über die Reaktion der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin nach 10tägiger Gabe von 160 mg LC/kg KG (2 Hunde der Gruppe I)

Kontrolle bis zum 32. Tag nach letzter LC-Applikation.

| VERLAUF                                                       | P A R A M E T E R |      |      |      |      |               |           |      |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|------|------|------|------|---------------|-----------|------|
|                                                               | AP                |      | GGT  |      | GLDH |               | Bilirubin |      |
|                                                               | Hd 1              | Hd 2 | Hd 1 | Hd 2 | Hd 1 | Hd 2          | Hd 1      | Hd 2 |
| 1. Tag                                                        | -                 | -    | -    | -    | -    | -             | -         | -    |
| 2. Tag                                                        | -                 | -    | -    | -    | -    | -             | -         | -    |
| 3. Tag                                                        | -                 | -    | -    | -    | -    | -             | -         | -    |
| 4. Tag                                                        | +                 | -    | -    | -    | -    | -             | -         | -    |
| 5. Tag                                                        | +                 | +    | -    | -    | +++  | -             | +         | +    |
| 6. Tag                                                        | +                 | +    | -    | -    | +++  | ++            | +         | -    |
| 7. Tag                                                        | ++                | +    | -    | -    | +++  | +++           | +         | -    |
| 8. Tag                                                        | +++               | ++   | +    | -    | +++  | +++           | ++        | +    |
| 9. Tag                                                        | +++               | ++   | +    | -    | +++  | ++            | +         | +    |
| 10. Tag                                                       | +++               | ++   | +    | -    | +++  | +             | ++        | +    |
| Erreichen der Ausgangsaktivität am - Tag nach Absetzen der LC | 26                | 32   | 4    | 5    | 15   | 19<br>(phys.) | 5         | 2    |

- keine Reaktion
- + geringgradige Reaktion, < 3fache Erhöhung der Ausgangsaktivität
- ++ mittelgradige Reaktion, > 3 < 5fache " " "
- +++ hochgradige Reaktion, > 5fache Erhöhung der Ausgangsaktivität

Die mit (phys.) gekennzeichneten Werte der GLDH weisen auf das Erreichen physiologischer, jedoch nicht der Ausgangsaktivitäten hin.

### 1.2.1.2. Verlaufskontrolle unter Dauerapplikation von LC

Bei den zwei untersuchten Hunden stellten sich, zeitlich unterschiedlich, Erhöhungen sämtlicher Parameter ein. Die Reaktion auf die Langzeitapplikation von 160 mg LC/kg KG kam dabei in kontinuierlich steigenden Enzymaktivitäten bzw. Bilirubinkonzentrationen zum Ausdruck. Gegen Ende des Versuchs begannen jedoch die meisten Werte wieder zu fallen.

Tab. 8: Verlauf der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin bei Dauerapplikation von 160 mg LC/kg KG bis zum 25. Tag (2 Hunde der Gruppe I)

#### P A R A M E T E R

| VERLAUF     | AP   |      | GGT  |      | GLDH |      | Bilirubin |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|-----------|------|
|             | Hd 1 | Hd 2 | Hd 1 | Hd 2 | Hd 1 | Hd 2 | Hd 1      | Hd 2 |
| 1. Tag      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -         | -    |
| 2. Tag      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -         | -    |
| 3. Tag      | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -         | -    |
| 4. Tag      | +    | -    | -    | -    | +++  | +    | -         | -    |
| 5. Tag      | +++  | -    | +    | -    | +++  | +    | -         | -    |
| 6.-10. Tag  | +++  | -    | ++   | -    | +++  | ++   | +         | -    |
| 11.-15. Tag | +++  | +    | +    | -    | +++  | +++  | +         | +    |
| 16.-20. Tag | +++  | ++   | +    | -    | +++  | +++  | +         | ++   |
| 21.-25. Tag | +++  | +++  | +    | ++   | +++  | +++  | +         | +++  |

- keine Reaktion

+ geringgradige Reaktion, < 3fache Erhöhung der Ausgangsaktivität

++ mittelgradige Reaktion, > 3 < 5fache Erhöhung d. "

+++ hochgradige Reaktion, < 5fache Erhöhung der Ausgangsaktivität

### 1.3. Erweiterung des Versuchsprogramms bei 160 mg LC/kg KG

Die Basis der cholestatistischen Wirkung oben genannter Dosis sollte nunmehr durch die vier Hunde der Gruppe II verbreitert werden. Der Versuch wurde nach 26tägiger Verabreichung von 160 mg LC/kg KG beendet.

Die einzelnen Ergebnisse stellt Tab. 9 gegenüber.

Tab. 9: Verlauf der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin bei Applikation von 160 mg LC/kg KG über 26 Tage (4 Hunde der Gruppe II)

| VERLAUF     | P A R A M E T E R |   |   |     |       |   |   |     |         |     |     |     |                   |   |   |     |
|-------------|-------------------|---|---|-----|-------|---|---|-----|---------|-----|-----|-----|-------------------|---|---|-----|
|             | A P               |   |   |     | G G T |   |   |     | G L D H |     |     |     | B i l i r u b i n |   |   |     |
|             | Hd 1              | 2 | 3 | 4   | Hd 1  | 2 | 3 | 4   | Hd 1    | 2   | 3   | 4   | Hd 1              | 2 | 3 | 4   |
| 1. Tag      | -                 | - | - | -   | -     | - | - | -   | -       | -   | -   | -   | -                 | - | - | -   |
| 2. Tag      | -                 | - | - | -   | -     | - | - | -   | -       | -   | -   | -   | -                 | - | - | -   |
| 3. Tag      | -                 | - | - | -   | -     | - | - | -   | -       | -   | -   | -   | -                 | - | - | -   |
| 4. Tag      | -                 | - | - | -   | -     | - | - | -   | -       | -   | -   | -   | -                 | - | - | -   |
| 5. Tag      | -                 | - | - | -   | -     | - | - | -   | -       | -   | -   | -   | -                 | - | - | -   |
| 6.-10. Tag  | -                 | - | - | +   | -     | - | - | -   | ++      | -   | -   | +++ | -                 | - | - | +   |
| 11.-15. Tag | -                 | - | - | +++ | -     | - | - | +++ | +       | +   | -   | +++ | -                 | - | - | +++ |
| 16.-20. Tag | +                 | - | - | +++ | -     | - | - | +++ | +++     | ++  | +++ | +++ | -                 | - | - | +++ |
| 21.-25. Tag | ++                | - | - | +++ | +     | - | - | +++ | +       | +++ | +   | +++ | -                 | - | - | +++ |

- keine Reaktion

+ geringgradige Reaktion, <3fache Erhöhung der Ausgangsaktivität

++ mittelgradige Reaktion, >3 <5fache Erhöhung der "

+++ hochgradige Reaktion, <5fache Erhöhung der Ausgangsaktivität

Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigte nur ein Hund bei allen vier untersuchten Merkmalen eine eindeutige Reaktion auf die gewählte LC-Dosierung.

Die drei anderen Hunde stellten die Reproduzierbarkeit der cholestatistischen Wirkung dieser Dosierung in Frage und machten die nächsten Versuche erforderlich.

#### 1.4. Weitere Dosissteigerungen

Nachdem sich in den vorhergehenden Untersuchungen Hinweise auf eine nicht homogene Reaktion der untersuchten Hunde bezüglich der LC-Belastung ergaben, kamen in den folgenden Experimenten nur noch gleichaltrige, reinrassige Beagles zum Einsatz.

##### 1.4.1. 240 mg LC/kg KG

Die Abbildungen 9 bis 12 zeigen eine Übersicht der Resultate bei der Dosis von 240 mg LC/kg KG.

Der Meß- und Medikationszeitraum bei täglicher LC-Gabe betrug 15 Tage.

Die Durchschnittskurve (Abb. 9) ergab sich aus dem Vergleich aller drei Hunde des Versuchs.

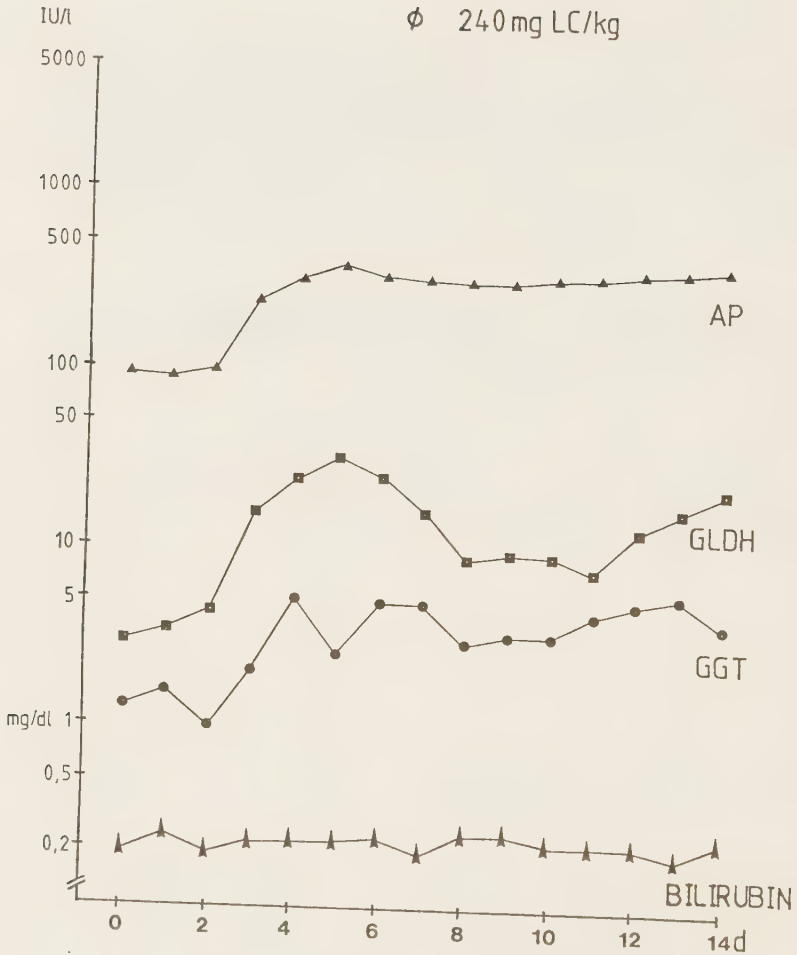


Abb. 9: Durchschnittswerte der Parameter AP, GLDH, GGT und Bilirubin, errechnet aus den drei im Versuch mit 240 mg LC/kg KG/d stehenden Hunden.

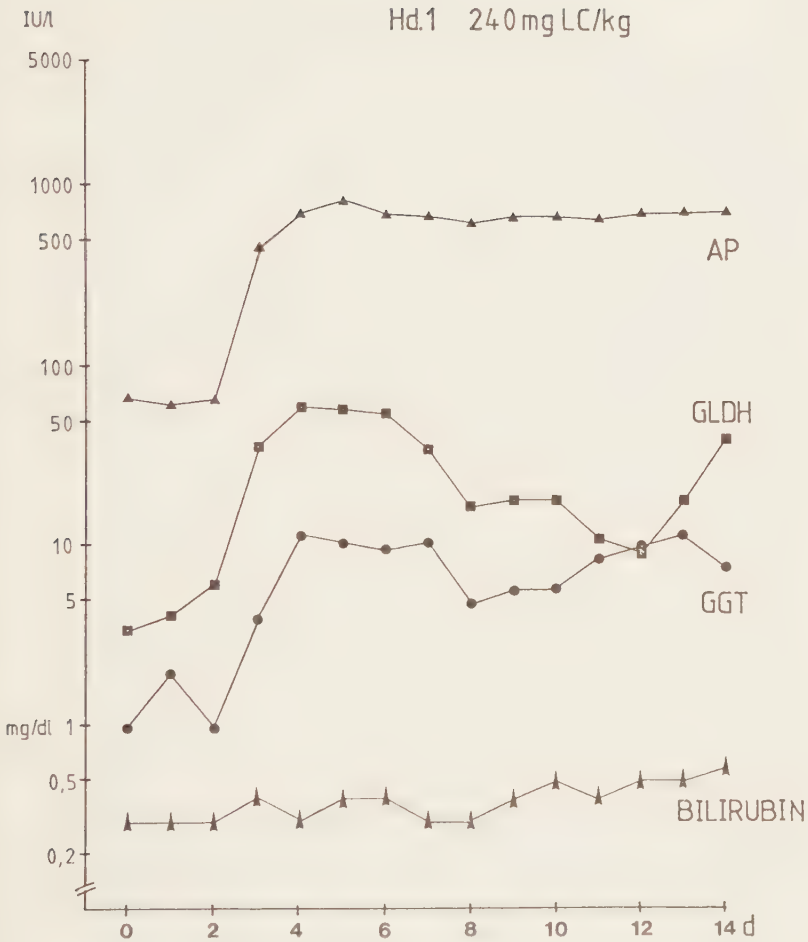


Abb. 10: Verlauf der Parameter AP, GLDH, GGT und Bilirubin bei Hund 1 des Versuchs mit 240 mg LC/kg KG/d.

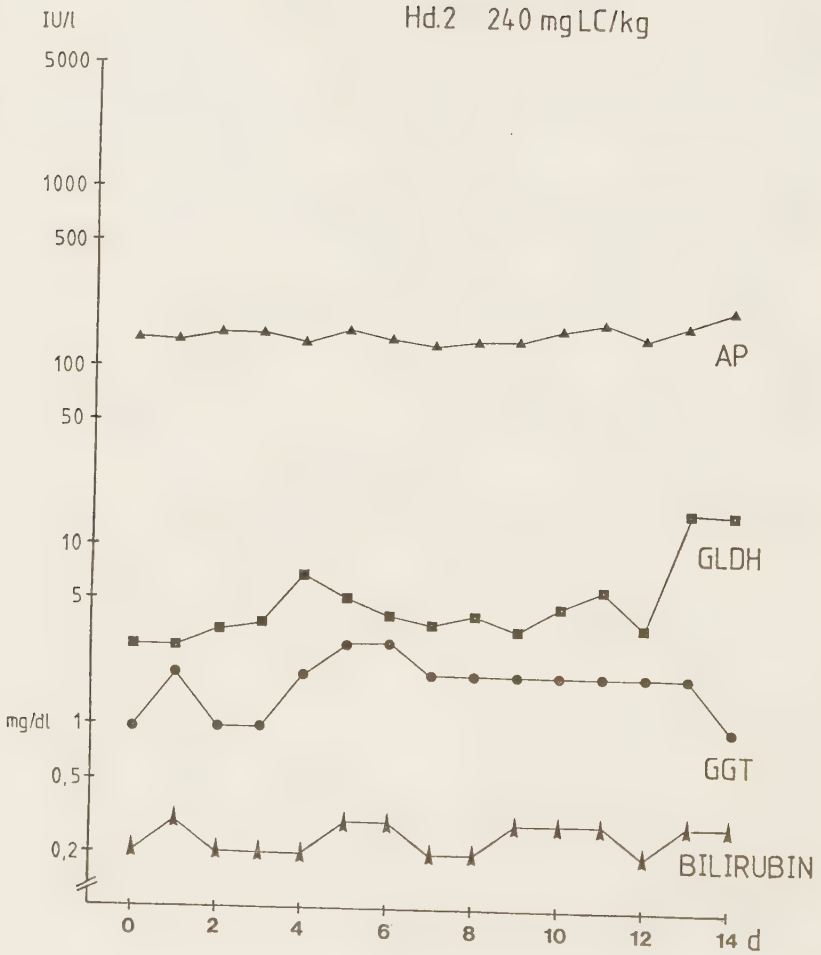


Abb. 11: Verlauf der Parameter AP, GLDH, GGT und Bilirubin bei Hund 2 des Versuchs mit 240 mg LC/kg KG/d.

Hd.3 240 mg LC/kg

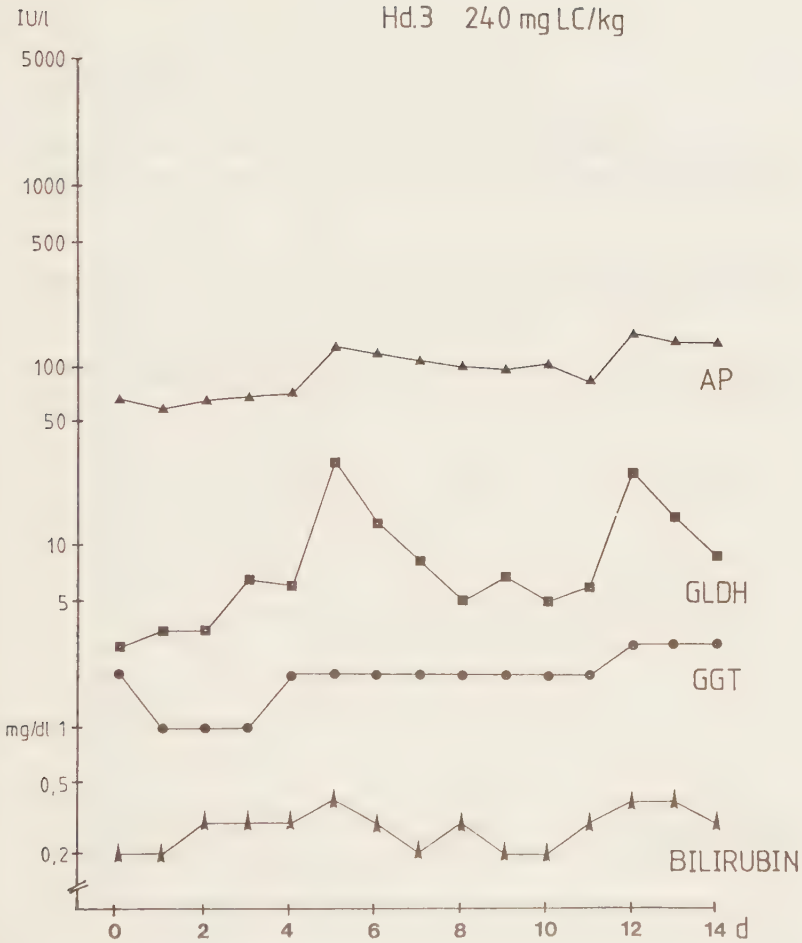


Abb. 12: Verlauf der Parameter AP, GLDH, GGT und Bilirubin bei Hund 3 des Versuches mit 240 mg/LC/kg KG/d.

#### 1.4.2. 400 mg LC/kg KG

Aufgrund der offensichtlich nicht in jedem Fall sicher zu erreichenden cholestatischen Wirkung der Dosis von 240 mg LC/kg KG wurde der nächste Schritt mit 400 mg LC/kg KG festgelegt. Der Meßzeitraum betrug wieder 15 Tage bei täglicher LC-Medikation.

Die Abbildungen 13 bis 16 zeigen eine Übersicht der Resultate bei der Dosis von 400 mg LC/kg KG.

Die Durchschnittskurve (Abb. 13) ergab sich aus dem Vergleich aller drei Hunde des Versuchs.

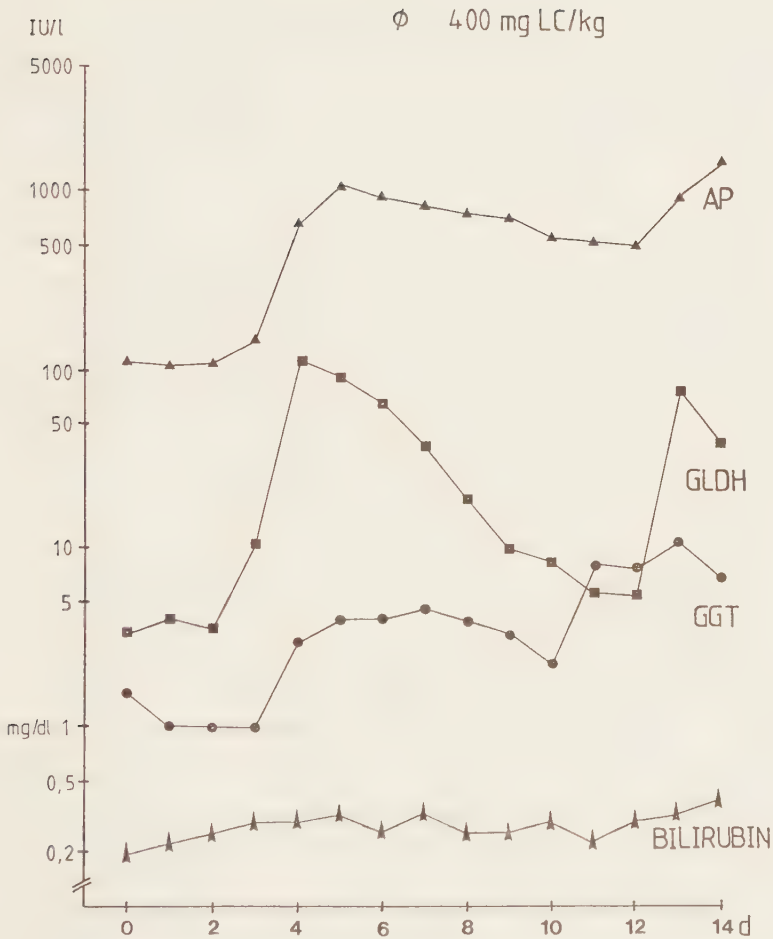


Abb. 13: Durchschnittswerte der Parameter AP, GLDH, GGT und Bilirubin, errechnet aus den drei im Versuch mit 400 mg LC/kg KG/d stehenden Hunden.

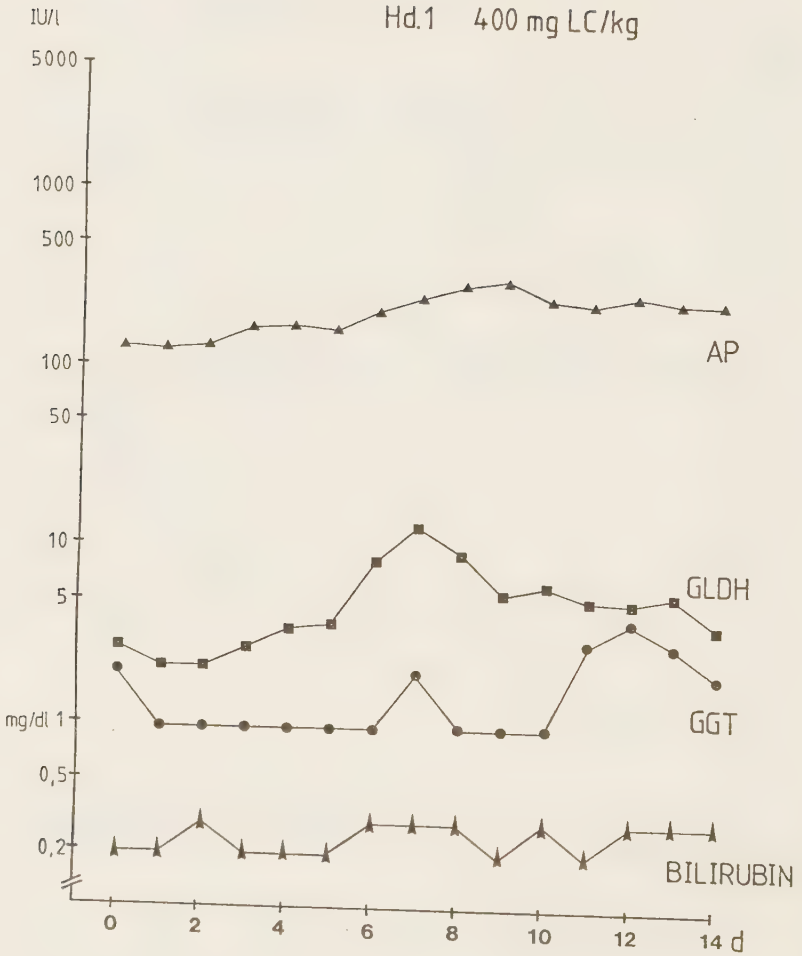


Abb. 14: Verlauf der Parameter AP, GLDH, GGT und Bilirubin bei Hund 1 des Versuchs mit 400 mg LC/kg KG/d.

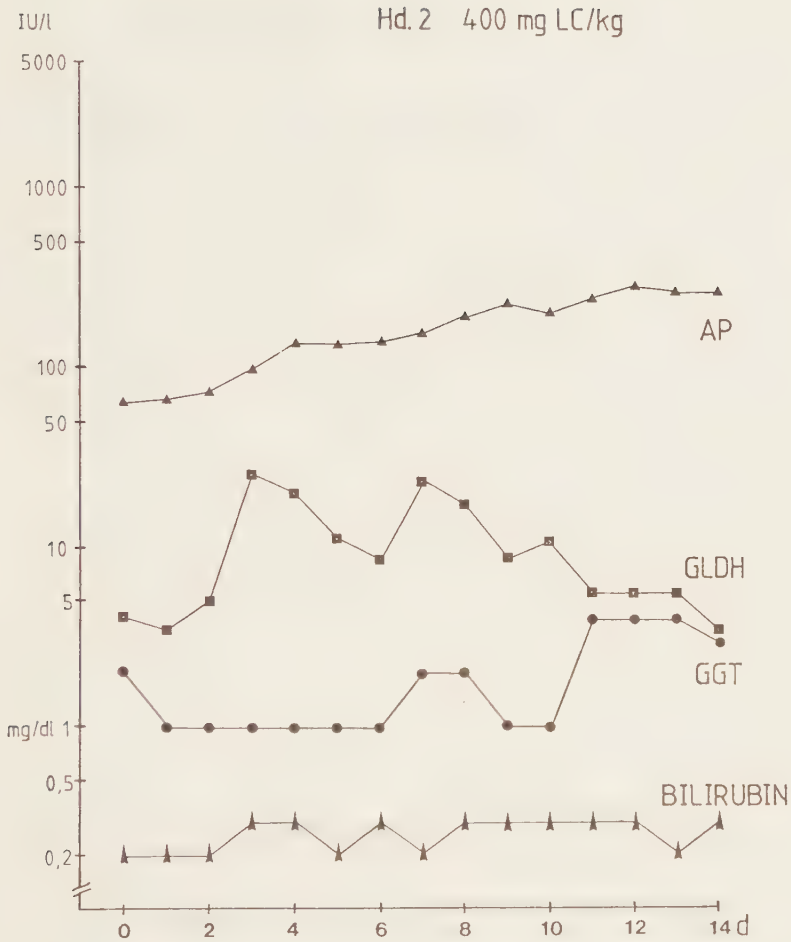


Abb. 15: Verlauf der Parameter AP, GLDH, GGT und Bilirubin bei Hund 2 des Versuchs mit 400 mg LC/kg KG/d.

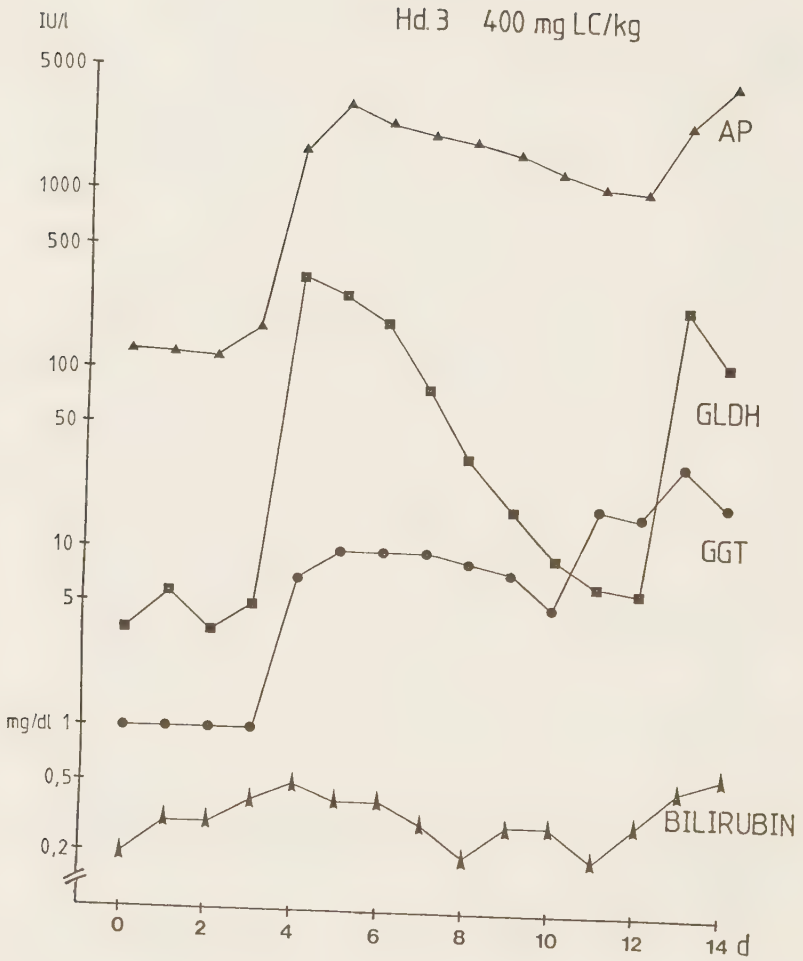


Abb. 16: Verlauf der Parameter AP, GLDH, GGT und Bilirubin bei Hund 3 des Versuchs mit 400 mg LC/kg KG/d.

#### 1.4.3. Enddosis 1000 mg LC/kg KG

Die immer noch mangelhaft ausgeprägte Reproduzierbarkeit der Cholestase erforderte eine weitere Dosissteigerung, die mit 1000 mg LC/kg KG festgelegt wurde.

Bei dieser Dosis ergaben sich, wie aus den Abb. 18 bis 20 und 21 bis 24 ersichtlich, bei allen drei Versuchshunden deutliche Veränderungen aller Parameter, die in ihrem jeweiligen Verlauf auch relativ einheitlich waren.

Eine Übersicht über die Durchschnittswerte gibt Abb .17.

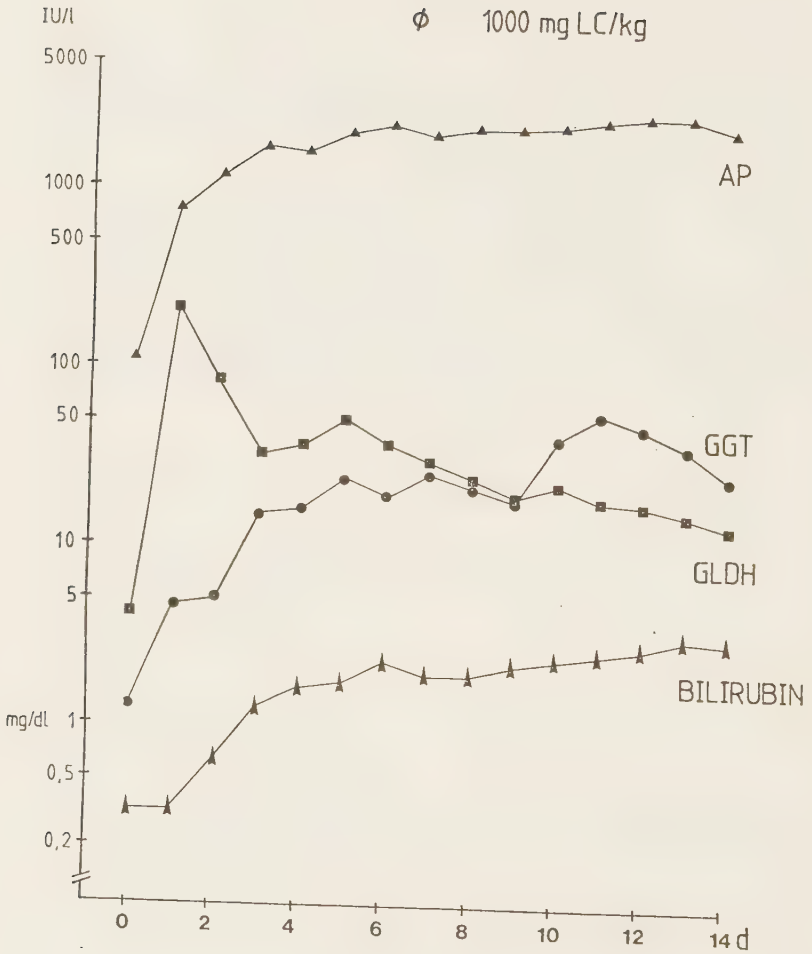


Abb. 17: Durchschnittswerte der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin, errechnet aus den drei im Versuch mit 1000 mg LC/kg KG/d stehenden Hunden.

Die Abbildungen 18 bis 20 zeigen das Verhalten der Enzymaktivitäten von AP, GGT und GLDH sowie der Serumkonzentration des Bilirubins während 15 Tagen à 1000 mg LC/kg KG bei den einzelnen der drei Hunde des Versuchs.

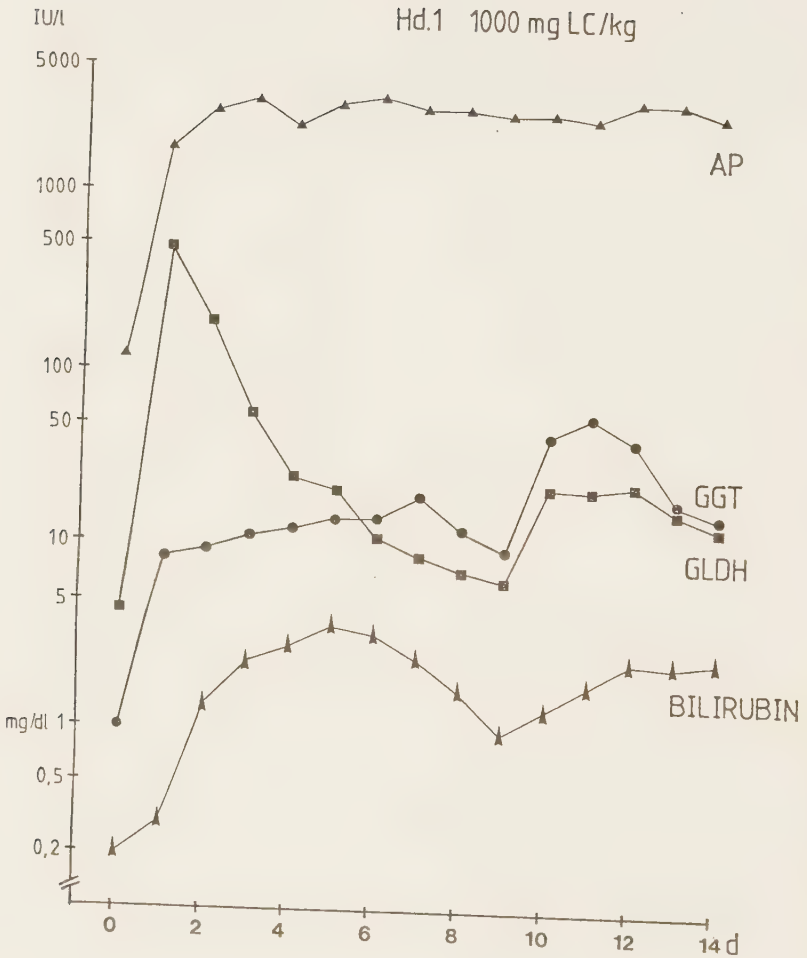


Abb. 18: Verlauf der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin bei Hund 1 des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d.

Hd.2 1000 mg LC/kg

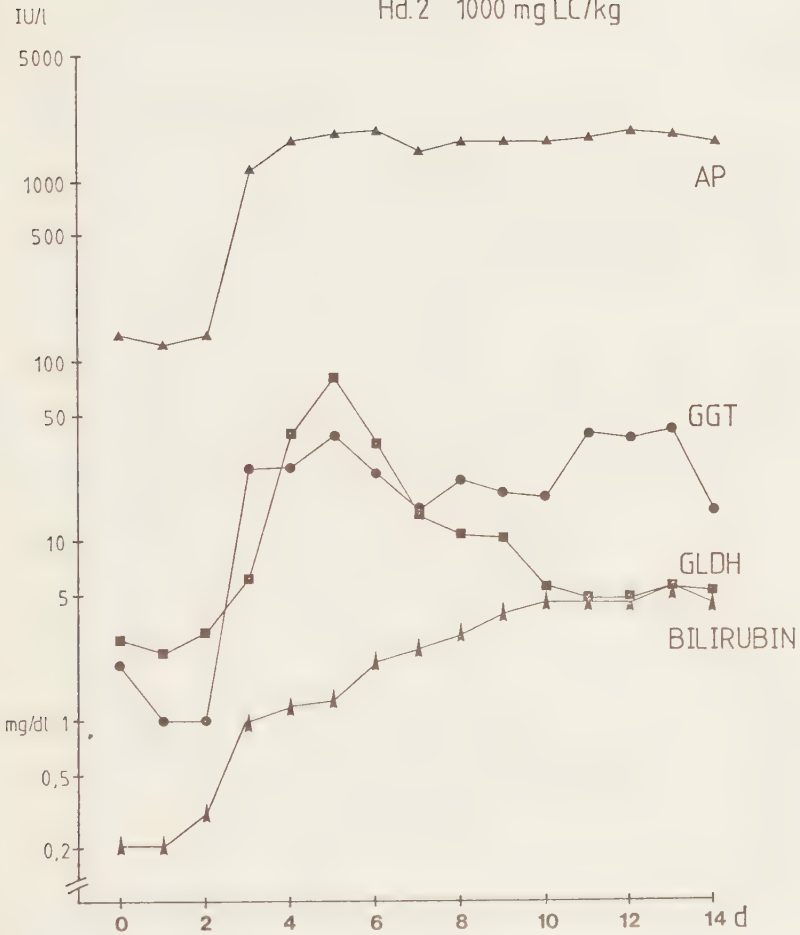


Abb. 19: Verlauf der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin bei Hund 2 des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d.

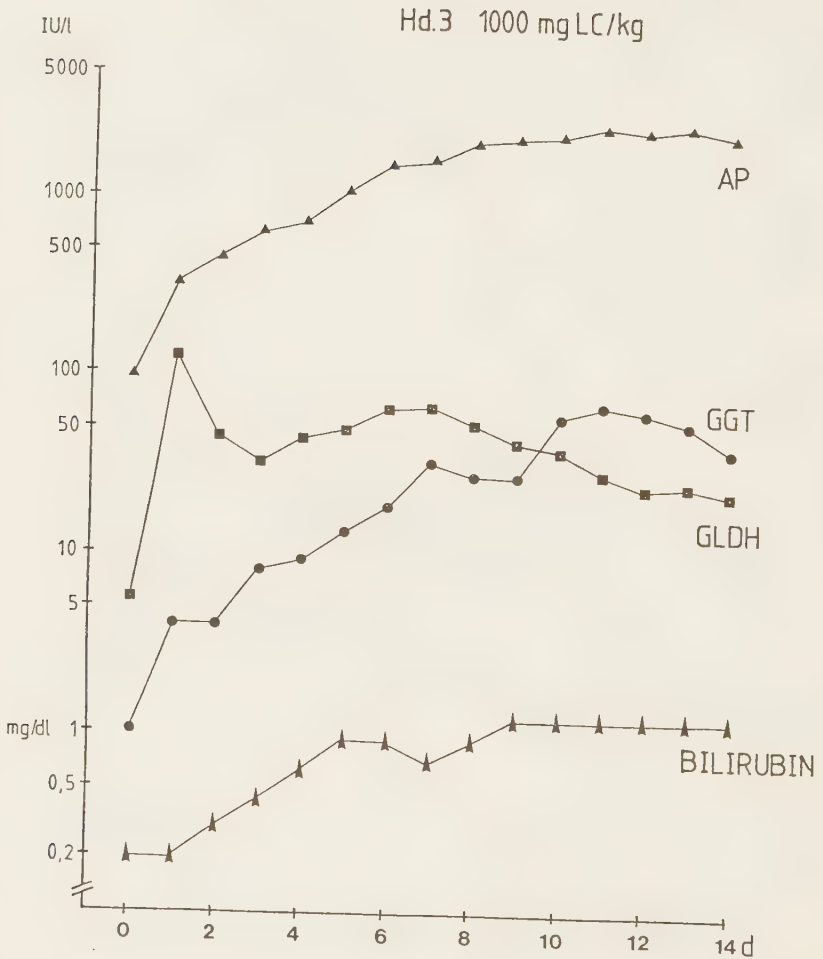


Abb. 20: Verlauf der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin bei Hund 3 des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d.

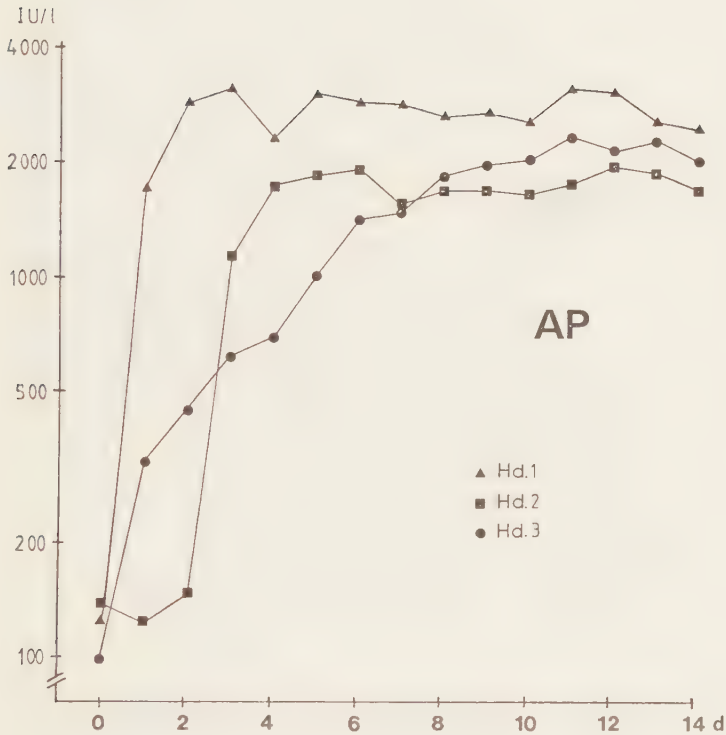


Abb. 21: Vergleich der Verlaufskurven der AP bei den drei Hunden des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG.

In den Abbildungen 21 bis 24 erfolgt der Vergleich jedes einzelnen Parameters bei den drei im Versuch stehenden Beagles.

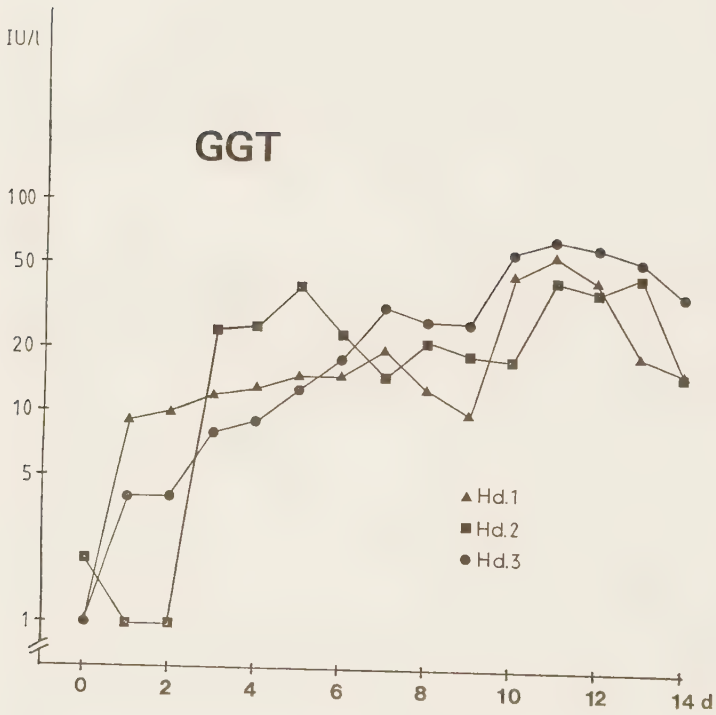


Abb. 22: Vergleich der Verlaufskurven der GGT bei den drei Hunden des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d.

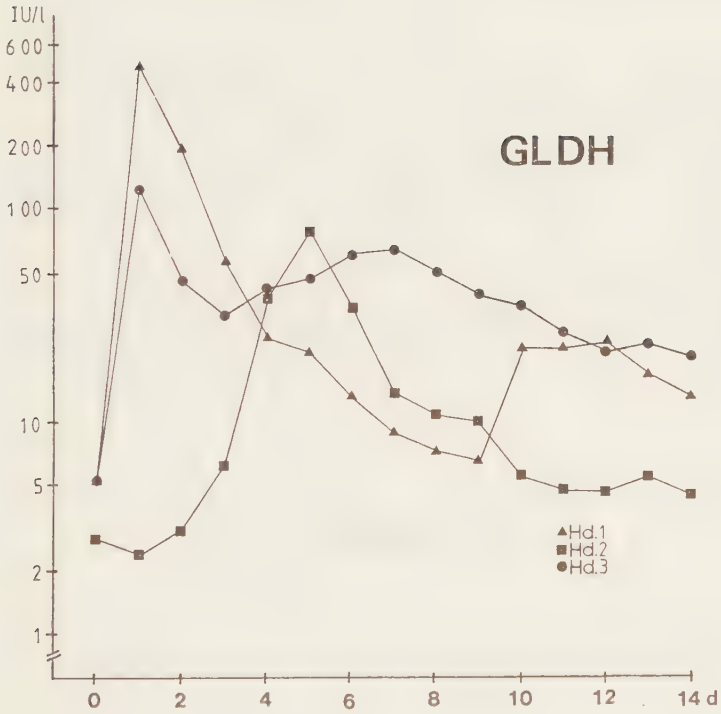


Abb. 23: Vergleich der Verlaufskurven der GLDH bei den drei Hunden des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d.

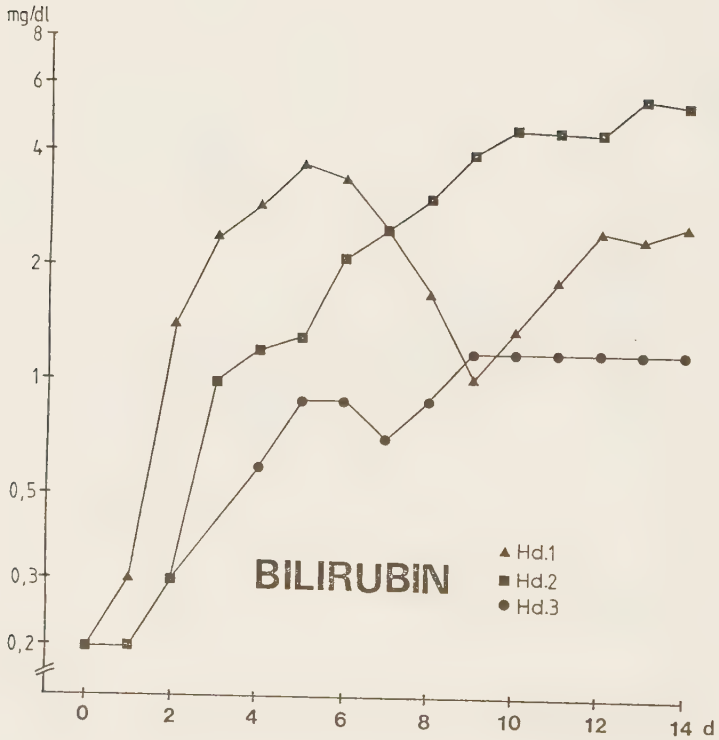


Abb. 24: Vergleich der Verlaufskurven des Bilirubins bei den drei Hunden des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d.

## 2. Applikation des Choleretikums "Clanobutin"

Die sich als cholestatisch wirksam erwiesene Dosis von 1000 mg LC/kg KG wurde als Basis für diesen Therapieversuch gewählt und bewies auch im folgenden Versuch ihre Reproduzierbarkeit.

Nach Erreichen eines cholestatischen Niveaus aller Parameter am 6.Tag der LC-Medikation (= Tag 5 der Kurven) begann die tägliche Gabe von 20 mg Clanobutin/kg KG. Diese Dosis wurde auf zwei Einzeldosen à 10 mg/kg KG verteilt und in 12stündigem Abstand verabreicht.

Die Abb. 25 zeigt den durchschnittlichen Verlauf der einzelnen Enzymaktivitäten bzw. der Bilirubinkonzentration im Serum von drei Hunden über einen LC-Applikationszeitraum von 20 Tagen und 14tägiger Therapie mit Clanobutin.

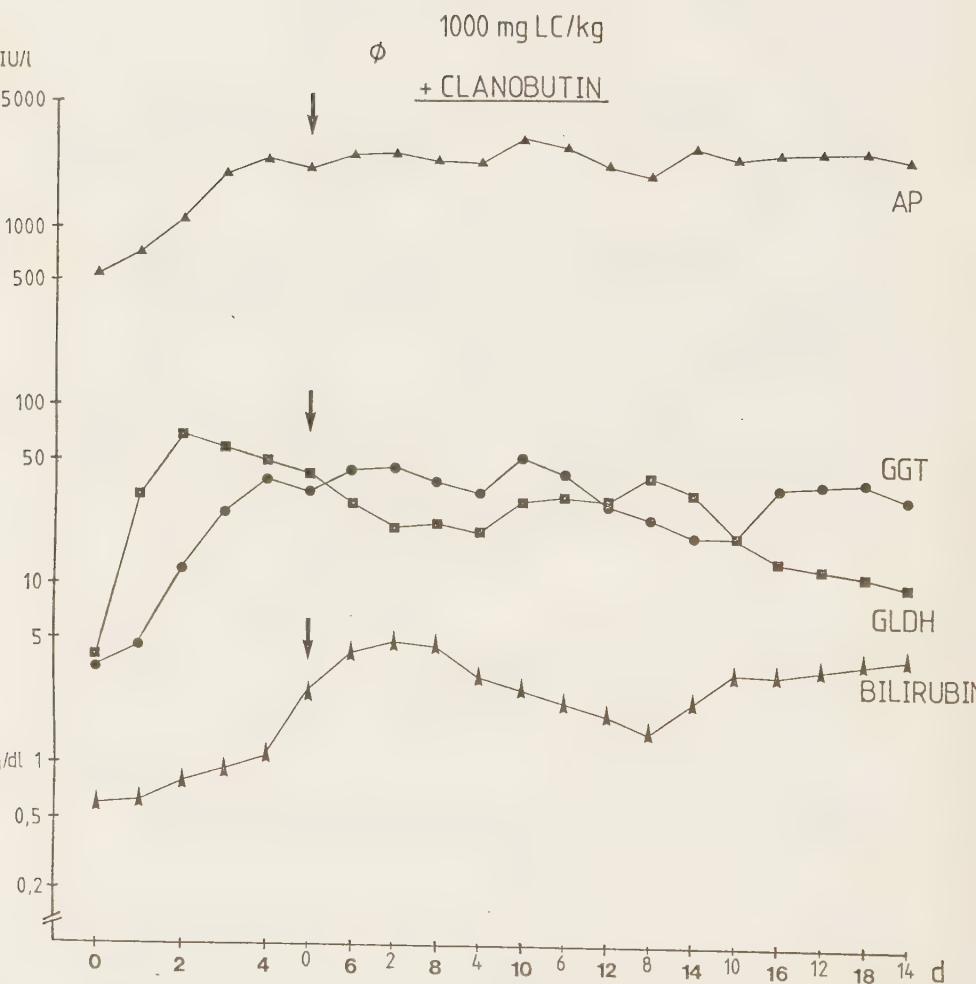


Abb. 25: Durchschnittswerte der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin, errechnet aus den drei im Versuch mit 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d stehenden Hunden. Der Pfeil kennzeichnet den Beginn des Clanobutineinsatzes am 5. Tag nach erster LC-Applikation. Der Beobachtungszeitraum für den Clanobutineffekt betrug 14 Tage (kleine Skala der Abszisse).

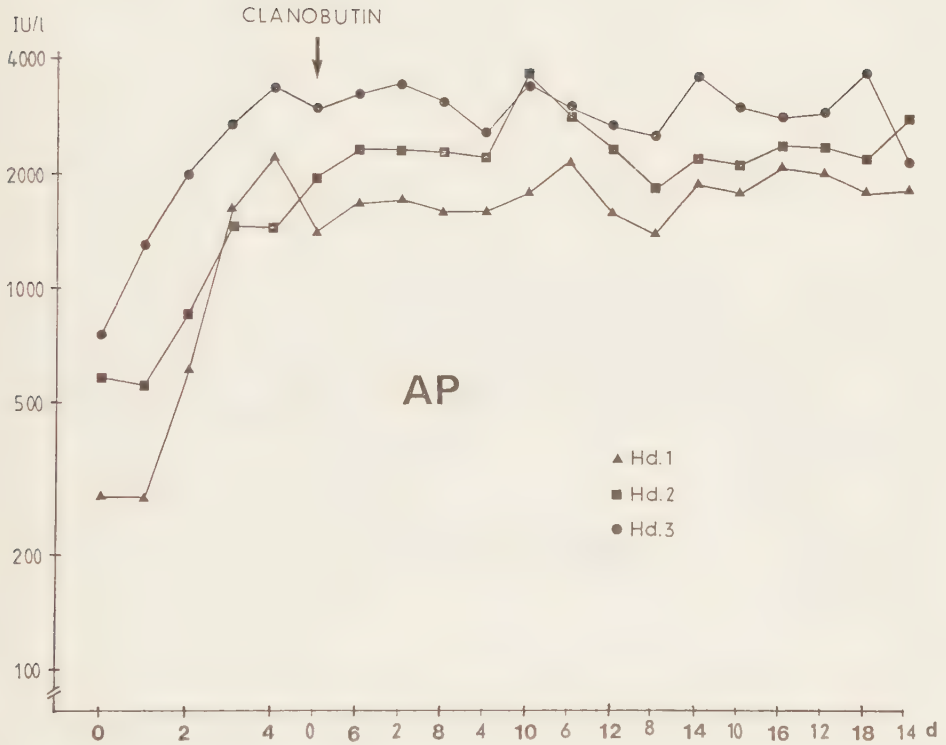


Abb. 26: Vergleich der Verlaufskurven der AP bei den drei Hunden des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d. Die Wirkung des Clanobutins, das vom 5. Tag nach erster LC-Applikation an zum Einsatz kam (Pfeil), wurde über 14 Tage verfolgt (kleine Skala der Abszisse).

Die Einzeldarstellungen der Enzyme AP, GGT, GLDH und des Bilirubins bei drei Hunden im gleichen Versuch ergeben sich aus den Abb. 26 bis 29.

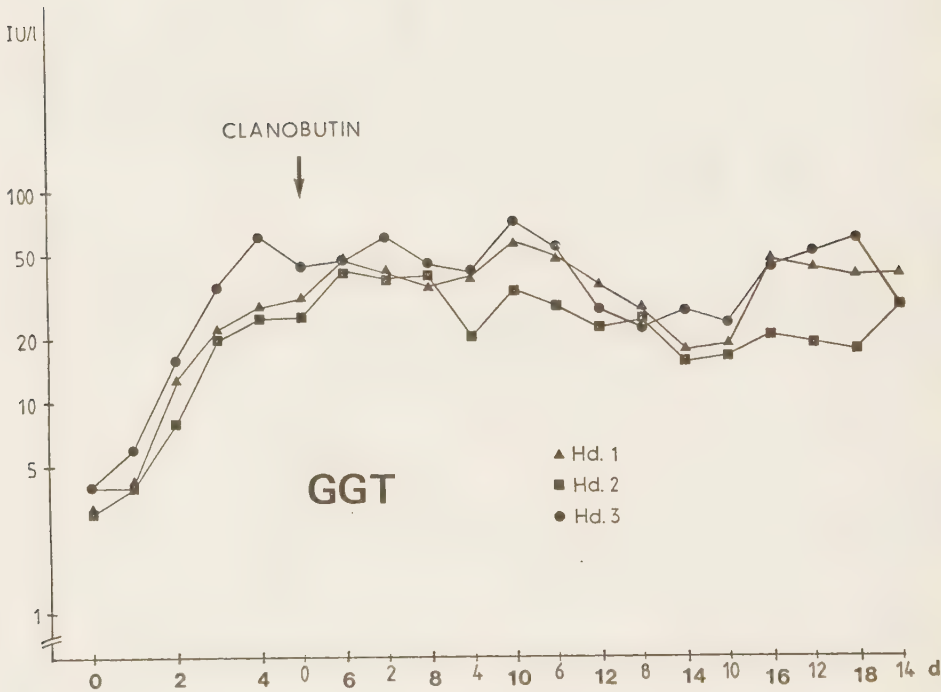


Abb. 27: Vergleich der Verlaufkurven der GGT bei den drei Hunden des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d. Die Wirkung des Clanobutins, das vom 5. Tag nach erster LC-Applikation an zum Einsatz kam (Pfeil), wurde über 14 Tage verfolgt (kleine Skala der Abszisse).

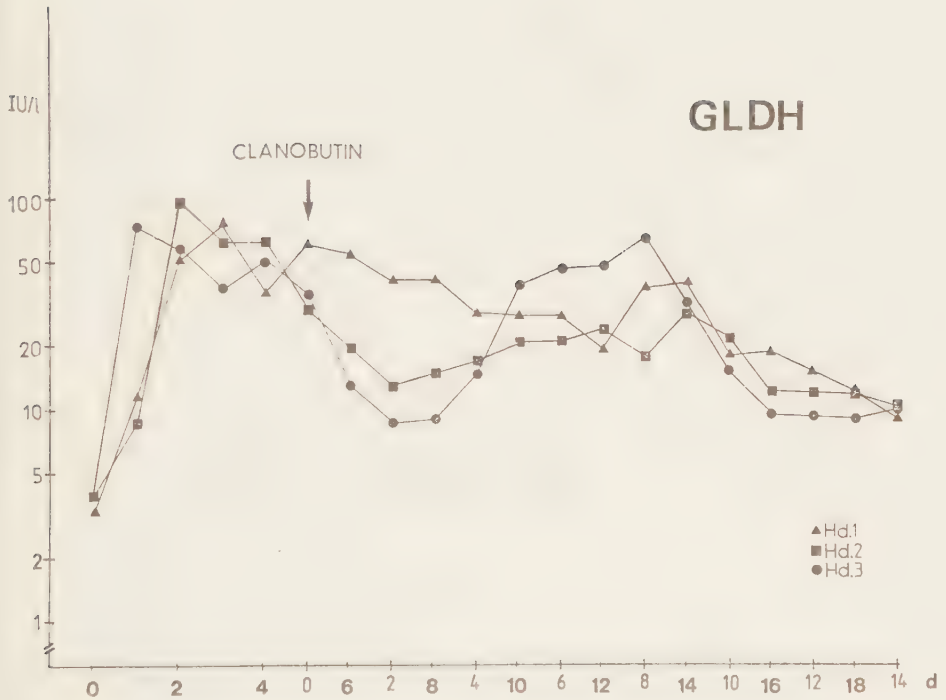


Abb. 28: Vergleich der Verlaufskurven der GLDH bei den drei Hunden des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d. Die Wirkung des Clanobutins, das vom 5. Tag nach erster LC-Applikation an zum Einsatz kam (Pfeil), wurde über 14 Tage verfolgt (kleine Skala der Abszisse).

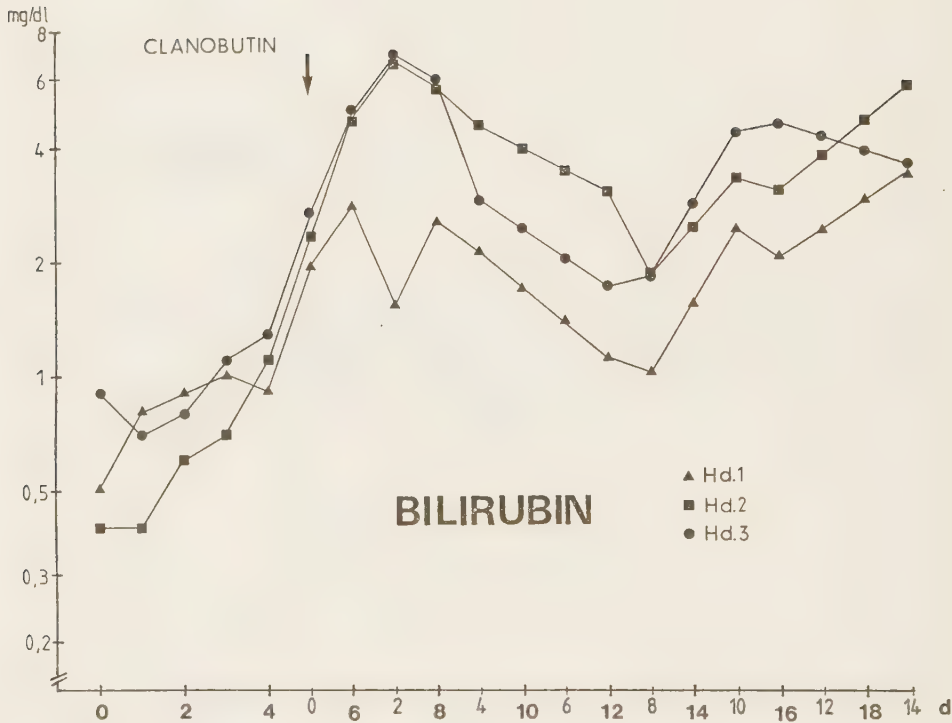


Abb. 29: Vergleich der Verlaufskurven des Bilirubins bei den drei Hunden des Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d. Die Wirkung des Clanobutins, das vom 5. Tag nach erster LC-Applikation an zum Einsatz kam, wurde über 14 Tage verfolgt (kleine Skala der Abszisse).

Um eine Veränderung genauer betrachten zu können, werden in Abb. 30 bis 33 die einzelnen Parameter der Versuche

1000 mg LC/kg KG mit Clanobutin  
und 1000 mg LC/kg KG ohne Clanobutin  
gesondert gegenübergestellt.

Die beiden Kurven in den Abbildungen 30 bis 33 repräsentieren Durchschnittswerte der drei Hunde, die in jedem Versuch eingesetzt waren.

IU/l

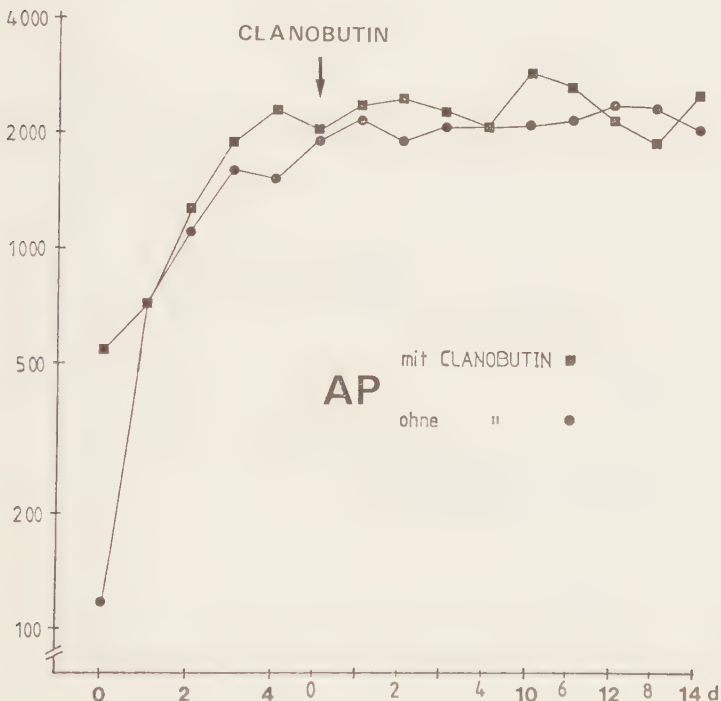


Abb. 30: Durchschnittswerte des AP-Aktivitätsverlaufs aus je drei Hunden zum Vergleich der Versuche:

- 1000 mg LC/kg KG/d
- 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d

Das Clanobutin kam vom 5. Tag nach erster LC-Applikation an zum Einsatz (Pfeil, kleine Skala der Abszisse).

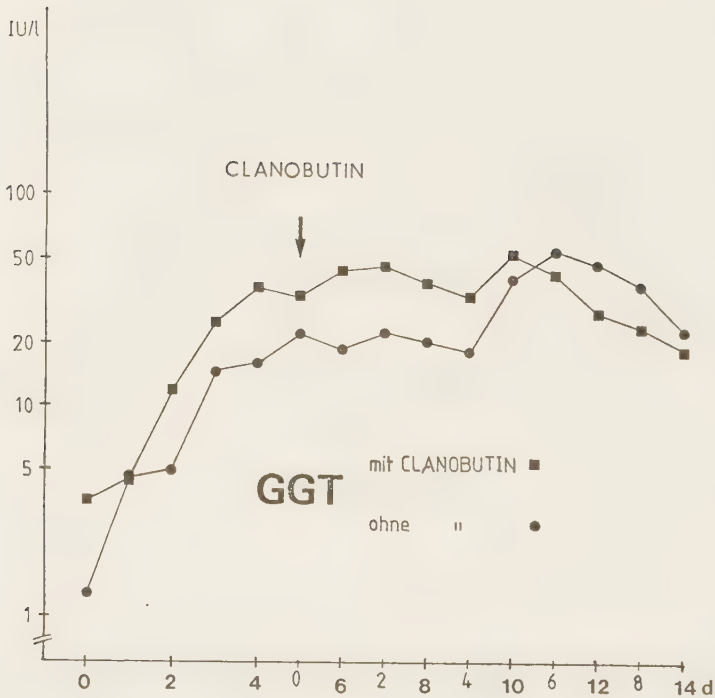


Abb. 31: Durchschnittswerte des GGT-Aktivitätsverlaufs aus je drei Hunden zum Vergleich der Versuche

- 1000 mg LC/kg KG/d

- 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d

Das Clanobutin kam vom 5. Tag nach erster LC-Applikation an zum Einsatz (Pfeil, kleine Skala der Abszisse).

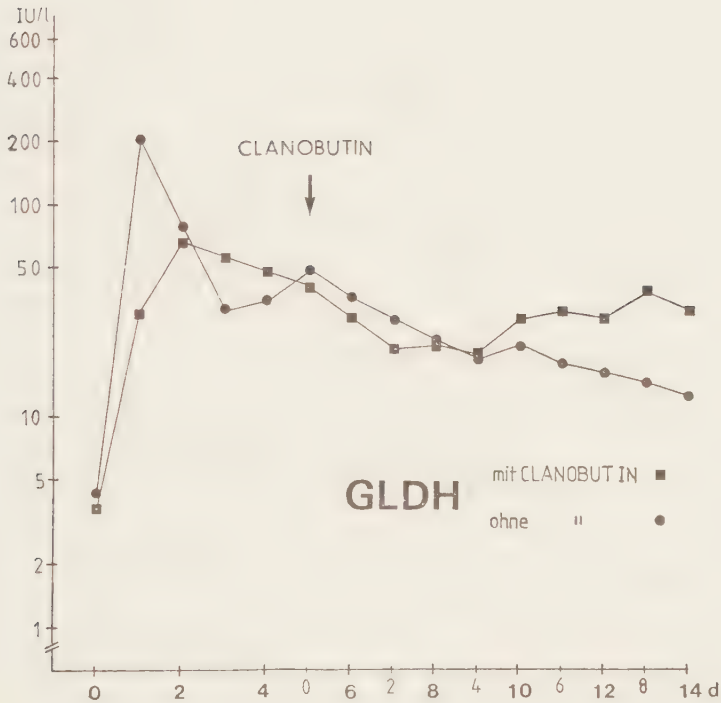


Abb. 32: Durchschnittswerte des GLDH-Aktivitätsverlaufs aus je drei Hunden zum Vergleich der Versuche

- 1000 mg LC/kg KG/d

- 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d

Das Clanobutin kam vom 5. Tag nach erster LC-Applikation an zum Einsatz (Pfeil, kleine Skala der Abszisse).

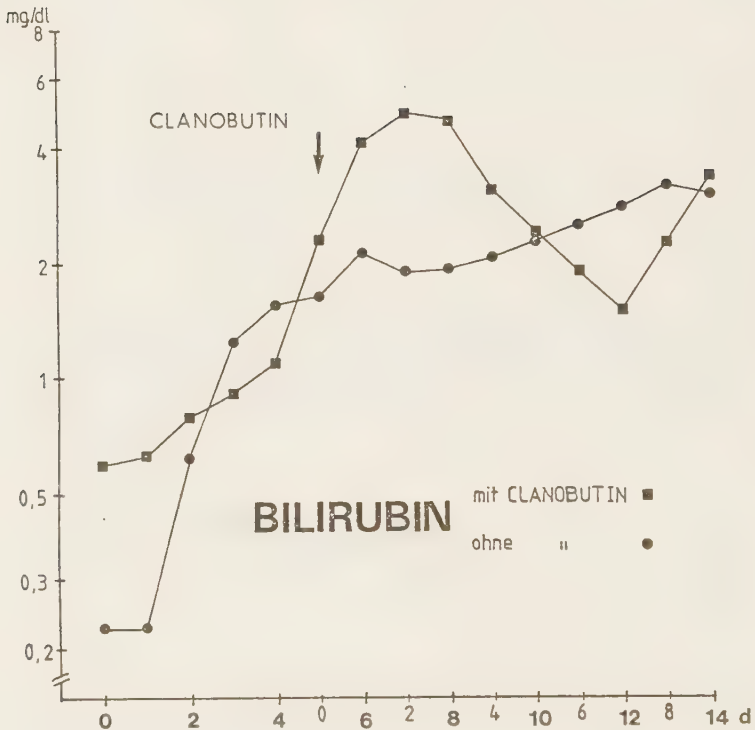


Abb. 33: Durchschnittswerte des Bilirubin-Konzentrationsverlaufs aus drei Hunden zum Vergleich der Versuche

- 1000 mg LC/kg KG/d
- 1000 mg LC/kg KG/d + 20 mg Clanobutin/kg KG/d

Das Clanobutin kam vom 5.Tag nach erster LC-Applikation an zum Einsatz (Pfeil, kleine Skala der Abszisse).

## V. Diskussion

### 1. Die Lithocholat-Cholestase als Modell einer intrahepatischen Cholestase

Die Eignung von Lithocholsäure (3-OH-Cholansäure) oder ihres Taurin-Konjugates für die Induktion einer intrahepatischen Cholestase ist für mehrere Tierspezies wie Ratte, Hamster, Kaninchen, Affe etc. nachgewiesen (37, 59, 65). Für den Hund liegen bis dato keine genauen Angaben vor. Beim Studium der intrahepatischen Cholestase erweist sich die Lithocholsäure (LC) anderen Cholestatika weit überlegen, indem sie die Forderungen, die an ein Cholestasemodell gestellt werden, noch am besten erfüllt:

- a) Durch ihr natürliches Vorkommen im Organismus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen entspricht ihre experimentelle Anwendung einer iatrogenen intrahepatischen Cholestase.  
Frühere Methoden, wie z.B. die Tetrachlorkohlenstoffintoxikation, führten zu reinen Leberparenchymschäden mit Lysis des Zytoplasmas, massiver Zerstörung der Zellorganellen, Zellnekrosen und weiteren Organschäden. Dadurch stehen diese Methoden im Vergleich zur Anwendung der Lithocholsäure weit zurück.
- b) Die Dosisabhängigkeit und Reproduzierbarkeit der cholestatischen Wirkung konnten bei allen bisher untersuchten Spezies demonstriert werden (37, 51). Nach den vorliegenden Untersuchungen scheint eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Hund möglich.
- c) Die LC-induzierte Cholestase geht mit spezifischen morphologischen Veränderungen einher, die von vielen Autoren ausführlich beschrieben werden (24, 32, 33, 34, 35, 85). Dabei stehen die canaliculäre Membran und die Alterationen ihrer molekularen Organisation im Mittelpunkt der Veränderungen (55, 59, 60).

- d) Auch die Reversibilität durch Taurocholsäure stellt einen wichtigen Aspekt der Lithocholsäure-Cholestase dar (63).

Als Beurteilungskriterien einer sich bei Anwendung steigender Lithocholsäure-Dosen einstellenden Cholestase dienen die in der Humanmedizin als "cholestaseanzeigend" bezeichneten Enzyme AP und GGT sowie die schwere Zellschäden im Sinn einer Nekrose anzeigende GLDH. Zusätzlich wird das Verhalten des Serumbilirubinspiegels beobachtet.

Wie frühere Experimente zeigen, bestehen für die Empfindlichkeit der einzelnen Tierspezies gegenüber Lithocholsäure große Unterschiede. So führt beim Hamster eine Dosis von 250 mg LC/kg KG bereits zu einer ausgeprägten Cholestase, während es bei der Ratte 1000 mg LC/kg KG bedarf, um zu ähnlichen Bildern zu gelangen (37). Möglicherweise liegt der Grund für diese Unterschiede in verschiedenen Metabolisierungsschritten, wie z.B. der 6- $\beta$ -Hydroxylierung bei der Ratte oder der 7- $\alpha$ -Hydroxylierung beim Hamster. Für den Hund liegen diesbezüglich noch keine Ergebnisse vor. Es gibt jedoch Vermutungen, die auf eine Sulfatierung, ähnlich der des Menschen, als "Entgiftungsmechanismus" hinweisen (159).

## 2. Versuche zur experimentellen Induktion einer intrahepatischen Cholestase beim Hund

Da in der Literatur keine genauen Angaben über die für eine Cholestase beim Hund notwendigen Dosierungen vorlagen, wurden die Untersuchungen mit einer vergleichsweise geringen Dosis von 10 mg LC/kg KG begonnen. Erste Anzeichen einer sich einstellenden Hepatopathie der Versuchstiere stellten sich jedoch erst bei einer Dosis von 160 mg LC/kg KG ein. Dies wurde durch Anstiege der untersuchten Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin deutlich.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen FREITAG (159) und KNOLL (160), die am gleichen LC-Modell erste Veränderungen der Enzyme Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Alanin-Amino-Transferase), Sor-

bit-Dehydrogenase sowie der Serumgallensäuren bei einer Dosis von 160 mg LC/kg KG feststellten. Wie bei den in vorliegender Untersuchung bestimmten Merkmalen wurden bei 160 mg LC/kg KG ebenfalls keine eindeutig reproduzierbaren Erhöhungen ermittelt.

Bei der Dosis von 160 mg LC/kg KG stiegen die GLDH am 2.Tag, die AP am 3.Tag nach erster Applikation (p.p.a.) an. Das Maximum des GLDH-Anstiegs lag mit dem 18,3fachen der Ausgangsaktivität weit über dem der AP (9,7fach). Diese Aktivitätsanstiege wiesen auf das Vorliegen einer Hepatopathie bei der gewählten LC-Dosierung hin. Die anderen Parameter, GGT und Bilirubin, zeigten in diesem Versuch noch wenig (GGT) bis keine Veränderungen (Bilirubin).

In einem weiteren Versuch mit einer Dosis von 160 mg LC/kg KG sollte ermittelt werden, wie schnell die einzelnen Parameter nach Absetzen der Noxe vom cholestatischen Niveau wieder in den physiologischen Bereich zurückkehren.

Auch in diesem Versuch reagierte die GLDH vor der AP. Wieder überstiegen die Maximalwerte der GLDH diejenigen der AP. GGT- und Bilirubinspiegel waren wie im vorhergehenden Versuch in ihren Veränderungen weniger deutlich ausgeprägt.

AP :

Die Aktivitäten der AP kehrten zwischen dem 26. und 32. Tag nach Absetzen der LC zu den Ausgangswerten zurück. Auch von anderen Autoren (83, 85) wird beschrieben, daß die AP nach cholestatischen Lebererkrankungen beim Hund mit als letztes Enzym wieder in den physiologischen Bereich zurückkehrt. Dabei bleibt zu berücksichtigen, daß die AP eine relativ langsame Eliminationsgeschwindigkeit im Organismus besitzt (Halbwertszeit beim Menschen 3 bis 7 Tage, beim Hund ca.70 Stunden).

GGT :

Die Aktivitäten der GGT kehrten zwischen dem 4.und 5. Tag nach Absetzen der LC zu den Ausgangswerten zurück.

Die Werte der GGT hatten damit wesentlich schneller ihr Ausgangsniveau erreicht, als diejenigen der AP. Beim Menschen dagegen soll nach einer Cholestase die GGT-Aktivität deutlich länger erhöht bleiben als die AP-Aktivität (120).

#### GLDH :

Die Aktivitäten der GLDH kehrten zwischen dem 15. und 19.Tag nach Absetzen der LC zu physiologischen Werten zurück. Jedoch erreichten sie auch nach dem 30. Tag nach Absetzen der LC noch nicht die Ausgangsaktivität.

Die Verlaufskurve der GLDH wies bei allen drei untersuchten Hunden größere Schwankungen auf. Auch nach Absetzen der LC-Dosis kam es gelegentlich zu Aktivitätsanstiegen, die ursächlich schwer zu erklären sind. Da diese Abweichungen über jeweils mehrere Tage bestehen blieben und bei allen drei Hunden zeitlich unterschiedlich auftraten, müssen sie als versuchsbedingt interpretiert werden. Offenbar liegt eine länger dauernde Schädigung der Leber vor, die auch nach Absetzen der LC noch fortwährt. Aufgrund des nicht systematischen Auftretens scheiden systematische oder sogar "grobe" Fehler bei der Bestimmung aus. Die gleichzeitige Erhöhung auch anderer Enzyme wie der GPT, die als sehr empfindlicher Indikator für Leberzellschäden gilt, läßt an "cholestatistische Schübe" denken, die allerdings zur Zeit noch nicht genauer interpretierbar sind.

#### Bilirubin :

Der Serumbilirubinspiegel kehrte zwischen dem 2. und 5. Tag nach Absetzen der LC nach lediglich geringen Anstiegen zu den Ausgangswerten zurück.

Bei diesem Verhalten spielen die Besonderheiten des Bilirubinstoffwechsels beim Hund, wie die niedrige Nierenschwelle für konjugiertes Bilirubin, sicher eine wesentliche Rolle. Die "unzuverlässige" Reaktion des Bilirubins bei Lebererkrankungen des Hundes wird durch die vorliegende Arbeit erneut unterstrichen. Dies zeigt, daß das Serumbilirubin als "Such-

methode" für Lebererkrankungen des Hundes weniger geeignet ist, da es im Vergleich zu anderen Parametern (Leberenzyme, Serumgallensäuren) zu träge und vor allem zu spät reagiert.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Wirkung einer Langzeitapplikation von Lithocholsäure auf die Enzyme AP, GGT, GLDH und das Bilirubin untersucht werden. Die Gabe von 160 mg LC/kg KG führte zu einer Leberschädigung, die in stetig höher steigenden Enzymaktivitäten und zum Teil auch Bilirubinkonzentrationen zum Ausdruck kam. Dabei zeigte sich, daß die AP und GLDH aufgrund ihrer schnelleren und stärkeren Reaktion den beiden anderen Parametern in ihrem diagnostischen Wert überlegen sind. Obwohl die Maximalwerte bei beiden Hunden erst gegen Ende des Experimentes gemessen wurden, kam es zum Schluß der Versuchsperiode zu einem auffälligen Absinken der Verlaufskurven sämtlicher Parameter. Eine Klärung dieses Phänomens muß einer weiteren Untersuchung vorbehalten bleiben.

Zur Bestätigung der cholestatischen Wirkung von 160 mg LC/kg KG wurde das Versuchsprogramm auf die vier Hunde der Gruppe II erweitert.

Bei drei Tieren dieser Gruppe blieben eindeutige Reaktionen der Parameter auf die Lithocholsäureapplikation aus. Bei diesen Hunden ließ lediglich die GLDH geringfügige Aktivitätsanstiege erkennen. Von diesen Tieren unterschied sich der vierte Hund dieser Gruppe, da bei ihm Aktivitätsanstiege der AP und GLDH gemessen wurden, die den Ergebnissen der vorliegenden Versuche vergleichbar waren. Erstmals zeigten auch die beiden anderen Untersuchungskriterien GGT und Bilirubin deutlichere Reaktionen. Die Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens ist nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise spielt das Alter der Versuchstiere eine entscheidende Rolle. Das einzig positiv reagierende Tier war ca. 4 bis 5 Jahre älter als die übrigen Tiere dieser Gruppe und entsprach in seinem Alter eher den Tieren der Gruppe I. Die Klärung einer altersabhängigen bzw. individuellen Disposition von Hunden gegenüber Lithocholsäure wäre von Interesse, konnte aber im Rahmen dieser Arbeit nicht verfolgt werden.

Um Streuungen der Ergebnisse einzuschränken, wurde in allen folgenden Versuchen nur einheitliches Tiermaterial verwendet, das aus gleichaltrigen, reinrassigen Beaglerrüden bestand (Gruppe III). Da sich in den bisherigen Versuchen keine einheitliche Reaktion auf die Dosierung von 160 mg LC/kg KG erkennen ließ, wurde bei drei Hunden der Gruppe III die Versuchsdosis auf 240 mg LC/kg KG gesteigert.

Bei zwei Tieren dieser Gruppe konnten auch mit 240 mg LC/kg KG keine eindeutigen Erhöhungen der untersuchten Enzymaktivitäten und des Bilirubinspiegels erzielt werden. Lediglich die GLDH zeigte wiederum geringfügige Aktivitätszunahmen. Bei dem zweiten Tier dieser Gruppe (Hund 1) entsprach der Verlauf der untersuchten Enzymaktivitäten und des Bilirubinspiegels weitgehend den Ergebnissen des Versuchs bei Langzeitapplikation von 160 mg LC/kg KG.

Dabei stiegen die Aktivitäten der GLDH und der AP nach zwei Tagen p.p.a. auf hohe Werte an, die bei der GLDH im weiteren Verlauf allmählich abfielen, während es bei der AP zu der Ausbildung eines Plateaus kam, das über den gesamten Versuchszeitraum erhalten blieb.

Die Veränderungen der beiden anderen Parameter GGT und Bilirubin erbrachten nur undeutliche Hinweise auf die vorliegende Hepatopathie.

Diese Ergebnisse zeigen, daß auch mit 240 mg LC/kg KG keine zuverlässig reproduzierbare Cholestase zu erzielen ist. Als Ursache für die unterschiedlichen Resultate kamen individuelle Dispositionen der Versuchstiere in Frage.

Die Resultate im Versuch mit 400 mg LC/kg KG glichen annähernd denjenigen des vorhergehenden Versuchs. Von den drei untersuchten Beagles konnten bei zwei Tieren ebenfalls kaum Veränderungen der ermittelten Parameter festgestellt werden. Das dritte Tier (Hund 3) reagierte auf die Dosis von 400 mg LC/kg KG mit einem Aktivitätsanstieg der GLDH, der AP und erstmals auch einer geringgradigen Zunahme der GGT-Aktivität. Die An-

stiege der GLDH- und AP-Aktivität waren noch stärker ausgeprägt als beim einzig positiv reagierenden Tier des vorherigen Versuchs. Daraus ließ sich erstmals eine dosisabhängige Wirkung der LC auf die Aktivitäten der Enzyme GLDH, AP und GGT erkennen.

Um eine einheitlich cholestatisch-wirksame LC-Dosis zu ermitteln, wurde schließlich die Wirkung von 1000 mg LC/kg KG an drei Hunden der Gruppe III untersucht.

Mit dieser Dosierung konnten erstmals bei allen Versuchstieren Resultate erzielt werden, die auf die Entstehung einer ausgeprägten Hepatopathie schließen ließen.

Dies zeigte sich nicht nur in hohen Anstiegen der GLDH und AP-Aktivitäten, sondern erstmals auch in einer deutlichen Erhöhung der GGT-Aktivität sowie des Bilirubinspiegels. Dabei wies der Bilirubinspiegel gegenüber den anderen untersuchten Parametern einen verzögerten Anstieg und eine stärkere Streuung auf.

Die sich bei der Dosis von 400 mg LC/kg KG abzeichnende, dosisabhängige Wirkung der LC wurde bei der Dosis von 1000 mg LC/kg KG für sämtliche untersuchte Parameter bei allen Hunden bestätigt.

### 3. Versuche zur Therapie der experimentell induzierten Cholestase beim Hund

Die sich aus bisherigen Versuchen für die Induktion einer intrahepatischen Cholestase beim Hund ergebende notwendige Dosis von 1000 mg Lithocholsäure/kg KG diente als Grundlage eines Therapieversuchs. In diesem sollte der Einfluß des Choleretikums Clanobutin auf die experimentell ausgelöste Hepatopathie ebenfalls anhand der Parameter AP, GGT, GLDH und Bilirubin untersucht werden.

Für das Clanobutin wurde in einer früheren Arbeit eine choleretische Wirkung bei Hund und Ratte nachgewiesen (66). Bei der Ratte konnte mit diesem Choleretikum auch eine Tauroliothocholat-Cholestase aufgehoben werden (65).

Beim Versuch, einen ähnlich günstigen Einfluß auch auf die Lithocholat-Cholestase beim Hund nachzuweisen, wurden folgende Resultate erzielt:

Während der ersten 5 Tage p.p.a. wurde bei sämtlichen untersuchten Parametern ein im Vergleich zum vorangehenden Versuch mit 1000 mg LC/kg KG sehr ähnliches Verhalten festgestellt. Die Aktivitäten der Enzyme GLDH, AP und GGT stiegen bereits nach 2 Tagen p.p.a. auf hohe Werte an, während der Anstieg des Serumbilirubins wiederum verzögert eintrat.

Da die Versuchsanordnung dieses Therapieversuches derjenigen des vorangegangenen Versuchs mit 1000 mg LC/kg KG entsprach, bestätigen diese Ergebnisse die Reproduzierbarkeit der Cholestase-induzierenden Wirkung von 1000 mg LC/kg KG beim Hund. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte ein therapeutisch wirksamer Einfluß des Choleretikums Clanobutin nicht festgestellt werden. Mit einer Dosis von 20 mg Clanobutin/kg KG über 15 Tage ließen sich die Parameter GLDH, AP, GGT und Bilirubin nicht beeinflussen. Durch den Einsatz dieses Choleretikums konnte in keinem der untersuchten Fälle ein Absinken der signifikant erhöhten Werte bewirkt werden.

Bei der Beurteilung der Wirksamkeit von Clanobutin sollte berücksichtigt werden, daß bei der Ratte, wie sich bereits in der Arbeit von FIEBIGER (65) andeutet, für Clanobutin eine dosisabhängige Wirkung auf den Gallefluß besteht. Für die gewählten Versuchsbedingungen mit Ausprägung einer massiven Cholestase mag deshalb die Clanobutindosis von 20 mg/kg KG nicht ausreichen. Zusätzlich ist die choleretische Wirkung von Clanobutin beim Hund wesentlich geringer als bei der Ratte: Im Versuch von BERCHTOLD (66) ergab sich bei der Ratte eine Zunahme des Galleflusses von 80 - 100  $\mu$ l gegenüber dem Hund mit nur 11,5  $\mu$ l/ $\mu$ mol biliär sezernierten Clanobutins.

Die Gründe dafür sind noch unklar, doch könnten Unterschiede im hepatischen Metabolismus von Clanobutin verantwortlich sein. Zu denken wäre u.a. an die Bildung von Clanobutin-

Metaboliten bei der Ratte, die eine stimulierende Wirkung auf den gallensäureunabhängigen Gallefluß ausüben.

BERCHTOLD (66) konnte in der Galle von Clanobutin-therapierten Ratten neben unverändertem Clanobutin chromatographisch drei weitere Metaboliten finden, die jedoch nicht weiter analysiert wurden.

Nicht zuletzt muß auch an die duktiläre Modifikation der Galle durch Clanobutin gedacht werden, worauf Messungen der Erythritol-Clearance hinweisen. Hierfür kommt eine Verminderung der duktilären Rückresorption oder eine Stimulation der duktilären Sekretion in Betracht. Eine endgültige Abklärung dieser unterschiedlichen Wirksamkeit steht noch offen.

Die Ergebnisse des Therapieversuchs deuten jedoch eher darauf hin, daß z.Zt. kein Pharmakon zur Verfügung steht, das eine intrahepatische Cholestase wirksam beeinflussen kann. In weiteren Untersuchungen ist zu klären, ob dem Clanobutin eine Wirkung bei spontanen Hepatopathien zukommt.

#### 4. Beurteilung der einzelnen Parameter als Indikatoren der Cholestase

Auch in der Humanmedizin werden die Grenzen der Enzymdiagnostik beim Vergleich der Enzymmuster verschiedener cholestatischer Lebererkrankungen deutlich (68, 137).

In der Tiermedizin ist bei Hund und Katze bislang noch kein Enzymmuster bekannt, das auf eine ganz spezielle Lebererkrankung schließen läßt (127).

Weitere Hinweise auf eine Erkrankung der Leber liefert auch der Anstieg der Serumgallensäuren (SGS). Aus Untersuchungen von FREITAG (159) wird ersichtlich, daß der Anstieg dieses Parameters ähnlich wie in den vorliegenden Enzym- und Bilirubinbestimmungen erst ab einer Dosis von 160 mg LC/kg KG einsetzt. Die Erhöhung der SGS scheint dabei etwas schneller und ausgeprägter als die Zunahme der Enzymaktivitäten und des Bilirubinspiegels zu erfolgen. Aus der Erhöhung der SGS,

die auch bei höheren LC-Dosen bis 1000 mg/kg/KG auftrat, kann auf das Vorliegen einer intrahepatischen Cholestase geschlossen werden. Der Anstieg der in dieser Arbeit untersuchten Enzymaktivitäten und Bilirubinspiegel ist ebenfalls als Folge dieser LC-induzierten intrahepatischen Cholestase aufzufassen.

Dem Vorteil der schnellen und deutlichen Reaktion der SGS steht der hohe technische Aufwand bei der Messung der SGS gegenüber. Dies schränkt ihre routinemäßige Bestimmung als Suchtest in der klinischen Diagnostik erheblich ein.

Die leberspezifischen Enzyme und das Serumbilirubin bleiben bei Erkrankungen der Leber ein wertvolles Diagnostikum. Wie aus der vorliegenden Arbeit ersichtlich, weist die experimentell durch LC induzierte intrahepatische Cholestase ein relativ typisches Verhaltensmuster der Enzyme GLDH, AP, GGT und des Bilirubins auf.

#### GLDH :

Die GLDH zeigte bereits bei geringen LC-Dosen Veränderungen, als die anderen Parameter noch keinerlei Veränderungen aufwiesen. Dieses Enzym, dessen Aktivitätserhöhung erst nach einer Schädigung der Cristaeschranke und der äußeren Mitochondrienhülle möglich ist, weist auf massive Leberzellschäden hin. Die auffälligen initialen Aktivitätsanstiege der GLDH, die auch bei Gallengangsverschlüssen beschrieben sind, lassen sich nur schwer erklären. Sie werden mit dem Auftreten disseminierter Einzelzellnekrosen erklärt, die durch Einwirkung der rückgestauten Galle entstehen. Auch der in der Literatur beschriebene, dem initialen Peak folgende Abfall der GLDH-Aktivitäten auf einen "cholestatischen Pegel", trat in den vorliegenden Untersuchungen regelmäßig und deutlich auf.

Somit erweist sich die GLDH besonders im Zusammenhang mit der Lithocholat-induzierten Cholestase als ein sehr sensibler Indikator.

AP :

Für die AP wurden stets gleichmäßige Aktivitätsanstiege gemessen, die bei geringen LC-Dosen etwas verzögert, bei 1000 mg LC/kg KG jedoch bereits am ersten Tag nach Einsatz der LC einsetzten. Im weiteren Verlauf des Versuchs trat eine ausgeprägte Plateaubildung auf deutlich erhöhtem Niveau auf. Extrem hohe Aktivitäten sind für intra- oder extrahepatische Cholestasen charakteristisch. Eine Differentialdiagnose zwischen beiden Formen der Cholestase ermöglicht sie jedoch nicht (83).

Das Verhalten der AP in den vorliegenden Versuchen ähnelt einem von VAN VLEET und ALBERTS (84) beschriebenen Experiment beim Hund. Dabei stieg die Aktivität der AP bei Gallengangsligatur zuerst verzögert, dann aber schnell an und erreichte am 7. Tag ihren Maximalwert.

Daß die AP der letzte Parameter ist, der wieder in den physiologischen Bereich zurückkehrt, erfährt auch hier seine Bestätigung. Sie erreichte erst am 26. bzw. 32. Tag nach Absetzen der Lithocholsäure wieder ihre Ausgangsaktivität und war damit der am längsten erhöhte Parameter der Untersuchung. Damit zeigt sich erneut, daß die AP gegenüber den anderen untersuchten Merkmalen eine gute Aussage auch über länger zurückliegende Leberschädigungen zu erbringen vermag. Zu erwähnen ist weiterhin, daß der Anstieg der AP meist lange vor dem des Bilirubins erfolgte. Dabei wurden für die AP auch über längere Zeit hohe Aktivitäten gemessen, ohne daß das Bilirubin Veränderungen aufwies.

GGT :

Daß die GGT nicht zu den Diagnostika erster Wahl bei der Feststellung hepatobiliärer Störungen des Hundes gehört, wird bereits in der Literatur deutlich. Sie besitzt allerdings gegenüber der AP den Vorteil der höheren Leberspezifität, eine Tatsache, die jedoch in der klinischen Labordiagnostik nicht überbewertet werden sollte.

Im Vergleich zu den Enzymen AP und GLDH blieb die Reaktion

der GGT in den vorliegenden Untersuchungen weit zurück. Deutlich erkennbare Aktivitätszunahmen traten erst bei der Dosis von 1000 mg LC/kg KG auf. Beim Menschen spielt die GGT in der Diagnostik von Hepatopathien eine übergeordnete Rolle. Hier soll die GGT die AP um den Faktor 10 an Empfindlichkeit übertreffen. Eine Übertragung dieser Verhältnisse auf den Hund scheint nach den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich zu sein. Nach KREBS (124) trifft dies in besonderem Maße auch für die Katze zu.

#### Bilirubin :

Auf die komplizierten Verhältnisse des Bilirubinstoffwechsels beim Hund wurde im Literaturteil bereits eingegangen. Durch die niedrige Nierenschwelle für Bilirubin II erscheinen geringere Konzentrationserhöhungen nicht im Serum.

Möglicherweise ist dies der Grund für das verzögerte Ansprechen des Bilirubins selbst bei hohen LC-Konzentrationen. Sehr hohe Bilirubinkonzentrationen treten bevorzugt bei extra- oder intrahepatischer Cholestase auf.

Als ein wesentlicher Faktor bei der Beurteilung der Reaktionen der untersuchten Parameter auf eine Dosis von 1000 mg LC/kg KG erschien die Tatsache, daß selbst bei dieser hohen LC-Dosis keine Enzymaktivitäten oder Bilirubinspiegel erreicht wurden, wie sie nicht auch bei spontan auftretenden Lebererkrankungen des Hundes gefunden werden.

Zusammengefaßt erweist sich das Bilirubin beim Hund in Zusammenhang mit einer LC-induzierten Cholestase als ein mäßig bis wenig empfindlicher Indikator, der in seinem diagnostischen Wert hinter den Enzymen GLDH, AP und GGT zurücksteht. Insgesamt erwies sich die Applikation von Lithocholsäure auch beim Hund als ein brauchbares Modell einer experimentell induzierten intrahepatischen Cholestase. Es empfiehlt sich somit als Grundlage weiterer Versuche.

## VI. Zusammenfassung

Am Modell der Lithocholat-induzierten intrahepatischen Cholestase wurde das Verhalten der Enzyme Alkalische Phosphatase (AP), Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) und des Gesamtbilirubins im Serum des Hundes bei steigenden Lithocholatdosierungen untersucht. Diese Parameter dienten als Indikator des sich entwickelnden Leberschadens.

Reproduzierbare Erhöhungen der Enzymaktivitäten und der Serumbilirubinspiegel traten bei einer Dosis von 1 g Lithocholsäure/kg KG auf.

In einem Therapieversuch wurde die Wirkung von 20 mg/kg KG des als Choleretikum angewandten Clanobutins (Bykahepar<sup>R</sup>) auf diese experimentell ausgelöste intrahepatische Cholestase untersucht.

Im einzelnen wurden folgende Resultate erzielt:

1. Die Lithocholsäure stellt auch beim Hund ein brauchbares Modell einer Hepatopathie dar, der offenbar eine intrahepatische Cholestase zugrunde liegt. Die Dosisabhängigkeit und Reproduzierbarkeit der cholestatischen Wirkung konnten nachgewiesen werden.
2. Die GLDH war in der angegebenen Versuchsanordnung der empfindlichste Indikator der Hepatopathie. In allen Versuchen waren initiale Anstiege auf hohe Werte für dieses Enzym charakteristisch.
3. Die AP bestätigte sich als ein wertvolles Diagnostikum hepato biliärer Störungen des Hundes. Etwas verzögerte, dann aber rasch einsetzende Aktivitätsanstiege mit über lange Zeit anhaltendem plateauähnlichem Verlauf waren typisch für diesen Parameter.
4. Die GGT erwies sich beim Hund im Vergleich zum Menschen als wenig sensibles, träger reagierendes Enzym, das erst bei relativ starken Noxen deutliche Aktivitätsanstiege zeigt.

5. Das Bilirubin konnte aufgrund der für den Hund nachgewiesenen geringen Nierenschwelle für konjugiertes Bilirubin nur begrenzt als Diagnostikum verwendet werden. Es zeigte im Gegensatz zu den untersuchten Enzymen erst bei relativ hohen LC-Dosierungen deutliche Reaktionen.
6. Clanobutin war unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht in der Lage, die Lithocholat-induzierten Erhöhungen der Enzymaktivitäten und Bilirubinkonzentrationen positiv zu beeinflussen.

## Summary

On the model of lithocholate-induced intrahepatic cholestasis the behaviour of the serum enzymes Alkaline-Phosphatase (SAP), Gamma-Glutamyl-Transferase (SGGT), Glutamic Dehydrogenase (SGLDH) and the total serum bilirubin was investigated in the dog under increasing doses of lithocholic-acid (LCA). These parameters served as an indicator of the developing hepatopathy.

Reproducible increases of the enzyme activities and the bilirubin levels occurred at a dosage of 1 g LCA/kg body weight.

In a therapeutical experiment the influence of 20 mg/kg body weight of Clanobutin (Bykahepar<sup>R</sup>), which is used as a choleretic, was investigated in the experimentally induced intrahepatic cholestasis.

The following results were obtained:

1. Lithocholic acid represents a useful model of a hepatopathy, the basis of which seems to be an intrahepatic cholestasis. Dosage-dependency and reproducibility of the cholestatic effect could be proved.
2. SGLDH was the most sensitive indicator of the hepatopathy under experimental conditions described above. During the whole experiment, fast initial rises to high activities were characteristic for this enzyme.
3. SAP was confirmed to be a valuable diagnostic aid of hepatobiliary disturbances of the dog. At first, this parameter increased slowly, but after that, it showed fast elevations to high levels similar to a plateau, which was retained for a long time.
4. SGGT in the dog was not as sensitive as in man. Its reaction is slower in the dog, and it increases only at relatively severe noxes.

5. Serum bilirubin could only limited be used as a diagnostic aid, because of the proved low renal threshold for conjugated bilirubin in the dog. In contrast to the serum enzymes it showed clear reactions only at relatively high doses of LCA.
6. Clanobutin was unable positively to influence the lithocholate-induced increases of the activity of liver enzymes and concentrations of bilirubin under the conditions mentioned above.

VII. Literaturverzeichnis

1. HOLSTI, P.  
Experimental cirrhosis of the liver in rabbits induced  
by gastric instillation of desiccated whole bile.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 112, 1-67 (1956)
2. HOLSTI, P.  
Further investigations on the cirrhogenetic effect of a  
desiccated whole bile preparation.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 50, 377-382 (1960)
3. HOLSTI, P.  
Bile acids as a cause of liver injury, cirrhogenic effect  
of chenodeoxycholic acid in rabbits.  
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 54, 479 (1962)
4. KRIEGER-HUBER, S.  
Leberdiagnostik beim Hund.  
Der praktische Tierarzt, 7, 413-415 (1975)
5. JUNGERMANN, S.D.  
Heterogeneity of liver parenchymal cells.  
Trends in Biochem. Sci. 3, 198-202 (1978)
6. EAKINS, M.N.  
Bile secretion and cholestasis.  
Biochemical Mechanisms of Liver Injury, ed. by T.F. Slater,  
Academic Press, London, New York, San Francisco, 15, 559-  
590 (1978)
7. RAZIN, E., FELDMAN, M.G., DREILING, D.A.  
Studies on biliary flow and composition in man and dog.  
J. Mount Sinai Hosp. N.Y. 32, 42-50 (1965)
8. WHEELER, H.O., ROSS, E.D., BRADLEY, S.E.  
Canalicular bile production in dogs.  
Am. J. of Physiol., 214/4, 866-874 (1968)

9. FORKER, E.L.  
Mechanisms of hepatic bile formation.  
Ann. Rev. Physiol. 39, 323-347 (1977)
10. SAMUEL, P., SAYPOL, G.M., MEILMAN, E., MOSBACH, E.,  
CHAFIZADEH, M.  
Absorption of bile acids from the large bowel in man.  
J. Clin. Invest. 47, 2070-2078 (1968)
11. SMALL, D.M., ADMIRAND, W.  
Solubility of bile salts.  
Nature 221, 265-267 (1969)
12. GANONG  
Lehrbuch der Medizinischen Physiologie.  
3. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York  
(1974)
13. FORKER, E.L.  
Two sites of bile formation as determined by mannitol  
and erythritol clearance in the guinea pig.  
J. Clin. Invest. 46, 1189-1195 (1967)
14. SPERBER, I.  
Secretion of organic anions in the formation of urine  
and bile.  
Pharmacol. Reviews 11, 109-134 (1959)
15. Ó MÁILLE, E.R.L., RICHARDS, T.G., SHORT, A.H.  
The influence of conjugation of cholic acid on its uptake  
and secretion: Hepatic extraction of taurocholate and  
cholate in the dog.  
J. Physiol. 189, 337-350 (1967)
16. HOFMANN, A.F., SMALL, D.M.  
Detergent properties of bile salts: Correlation with phy-  
siological function.  
Ann. Rev. Med. 18, 333 (1967)

17. LEVI, A.J., GATMAITAN, Z., ARIAS, I.M.  
Two cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfo-bromophthalein and other anions.  
J. Clin. Invest. 48, 2156-2167 (1969)
18. HABIG, W.H., PABST, M.J., FLEISCHNER, G., GATMAITAN, Z., ARIAS, I.M., JAKOBY, W.B.  
The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3879-3882 (1974)
19. ARIAS, I.M., FLEISCHNER, G., LISTOWSKY, I., KAMISAKA, K., MISHKIN, S., GATMAITAN, Z.  
On the structure and function of ligandin and Z protein.  
In: The Hepatobiliary System, ed. by W. Taylor pp., 88-104  
New York: Plenum Press (1976)
20. PAUMGARTNER, G.  
"Physiology of bile secretion: Bile acid-dependent bile flow".  
In: Liver and Bile, ed. by L. Bianchi, W. Gerok and K. Sickinger, 45-53, Lancaster, Plenum Press (1977)
21. HEATON, K.W.  
Bile salts in: "Liver and Biliary Disease", ed. by K.G.M.M. Wright, S. Karran and G.A. Millward-Sadler, W.B. Saunders Company, London, Philadelphia, Toronto (1979)
22. ERLINGER, S.  
Bile acid-independent secretion. In: "Liver and Bile", ed. by L. Bianchi, W. Gerok and K.S. Sickinger, 55-62 (1977)
23. ERLINGER, S., DHUMEAUX, D.  
Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolytes.  
Gastroenterology 66, 281-304 (1974)
24. ERLINGER, S.  
Cholestasis: Pump Failure, Microvilli Defect, or both?  
The Lancet, 533-535 (1978)

25. COWEN, A.E., CAMPBELL, C.B.  
Bile salt metabolism. I. The physiology of bile salts.  
II. Bile salt and disease.  
Aust. N.Z. J. Med. 7, 579-595 (1977)
26. HASLEWOOD, G.A.D.  
The biological significance of chemical differences in  
bile salts.  
Biol. Rev. 39, 537-574 (1964)
27. POPPER, H., SCHAFFNER, F.  
Pathophysiology of cholestasis.  
Human Pathology 1/1, 1-24 (1970)
28. POPPER, H.  
Cholestasis.  
Acta. Hepatol. Japonica. 19/10, 929-933 (1978)
29. THEUER, D.  
Leber- und Gallenwegserkrankungen. II. Biochemische Un-  
tersuchungen. In: Leber- und Gallenwegserkrankungen.  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1972)
30. POPPER, H., SCHAFFNER, F., DENK, H.  
Molecular pathology of cholestasis. In: W. Taylor (ed.),  
The Hepatobiliary System. Fundamental and Pathological  
Mechanisms. pp. 605-629, New York, Plenum Press (1976)
31. SCHAFFNER, F., POPPER, H.  
Causation and consequences of cholestasis: an overview.  
In: C.A. Goresky and M.M. Fisher (eds.), Hepatology - Re-  
search and Clinical Issues, Vol.2, Jaundice pp. 329-349,  
New York, Plenum Press (1975)
32. POPPER, H.  
Mechanism of cholestasis. In: Falk Symposium: Liver and  
Bile, ed. by Bianchi, Gerok, Sickinger, Proc. of the  
4. Int. Congr. of Liver Diseases, MTP 1977 (1976)

33. SCHAFFNER, F., POPPER, H.  
Cholestasis is the result of hypoactive hypertrophic smooth endoplasmatic reticulum in the hepatocyte.  
The Lancet, August 16, 355-359 (1969)
34. HUTTERER, F., BACCHIN, P.G., RAISFELD, I.J., SCHENKMAN, J.B., SCHAFFNER, F., POPPER, H.  
Alteration of microsomal biotransformation in the liver in cholestasis.  
Proc. Soc. exp. biol. 133, 702-706 (1970)
35. DENK, H.  
Die chemische Struktur des endoplasmatis. Reticulums und die Funktion des mikroosmalen Biotransformationssystems der Leberzelle der Ratte bei experimenteller Cholestase.  
Path. europ. 7/1, 43-65 (1972)
36. HOFMANN, A.F.  
Clinical implications of physicochemical studies on bile salts.  
Gastroenterology 48/4, 484-494 (1965)
37. PALMER, R.H.  
Bile acids, liver injury, and liver disease.  
Arch. Intern. Med. 130, 606-617 (1972)
38. PLAA, G.L., PRIESTLY, B.G.  
Intrahepatic cholestasis induced by drugs and chemicals.  
Pharmacol. Reviews 28, 207-273 (1977)
39. LEE, M.J., WHITEHOUSE, M.W.  
Inhibition of election transport and coupled phosphorylation in the liver mitochondria by cholanic bile acids and their conjugates.  
Biochem. Biophys. Acta 100, 317-328 (1965)
40. FRENCH, S.W., DAVIES, P.L.  
Ultrastructural localization of actin-like filaments in rat hepatocytes.  
Gastroenterology 68, 765-768 (1975)

41. ACCATINO, L., SIMON, F.R.  
Identification and characterization of a bile acid receptor in isolated liver surface membranes.  
J. Clin. Invest. 57, 496 (1976)
42. PHILLIPS, M.J., ODA, M. MAK, E., FISHER, M.M., JEEJEEBHOY, H.N.  
Microfilament dysfunction as a possible cause of intrahepatic cholestasis.  
Gastroenterology 69, 48-58 (1975)
43. FRENCH, S.  
Is cholestasis due to microfilament failure.  
Human. Pathol. 7, 243 (1976)
44. DE BROE, M.E., BORGERS, M., WIEME, R.J.  
The separation and characterization of liver plasma membrane fragments circulating in the blood of patients with cholestasis.  
Clin. Chim. Acta 59, 369-372 (1975)
45. DRIVAS, G., JAMES, O., WARDLE, N.  
Study of reticuloendothelial phagocytic capacity in patients with cholestasis.  
Br. Med. J. 1, 1568 (1976)
46. COWEN, A.E., KORMAN, M.G., HOFMANN, A.F., CASS, O.W.  
Metabolism of lithocholate in healthy man.  
I. Biotransformation and biliary excretion of intravenously administered lithocholate, lithocholyglycine and their sulfates.  
Gastroenterology 69, 59-67 (1975)
47. COWEN, A.E., KORMAN, M.G., HOFMANN, A.F., CASS, O.W., COFFIN, S.B.  
Metabolism of lithocholate in healthy man.  
II. Enterohepatic circulation.  
Gastroenterology 69, 67-77 (1975)

48. COWEN, A.E., KORMAN, M.G., HOFMANN, A.F., THOMAS, P.J.  
Metabolism of lithocholate in healthy man.  
III. Plasma disappearance of radioactivity after intravenous injection of labelled lithocholate and its derivatives.  
*Gastroenterology* 69, 77-82 (1975)
49. PRIESTLY, B.G. CÔTÉ, M.G., PLAA, G.L.  
Biochemical and morphologic parameters of taurolithocholate induced cholestasis.  
*Can. J. Physiol. Pharmacol.* 49, 1078-1091 (1971)
50. MIYAI, K., PRICE, V.M., FISHER, M.M.  
Bile acid metabolism in mammals ultrastructural studies on the intrahepatic cholestasis induced by lithocholic acids in the rat chenodesoxycholic.  
*Laboratory Investigation* 24/4, 292-302 (1971)
51. MIYAI, K., MAYR, W.M., RICHARDSON, A.L.  
Acute cholestasis induced by lithocholic acid in the rat. A Freeze Fracture Replica and Thin Section Study.  
*Lab. Invest.* 32/4, 527-535 (1975)
52. MIYAI, K., RICHARDSON, A.L., MAYR, W.M., JAVITT, N.B.  
Subcellular pathology of rat liver in cholestasis and cholestasis induced by bile salts. 1. Effects of lithocholic, 3  $\beta$ -Hydroxy-5 cholenoic, Cholic and Dehydrocholic Acids.  
*Laboratory Investigation* 36/3, 249-258 (1977)
53. LAYDEN, T.J., SCHWARZ, J., BOYER, J.L.  
Scanning electron microscopy of the rat liver - studies of the effect of taurolithocholate and other models of cholestasis.  
*Gastroenterology* 69, 724 (1975)
54. SCHAFFNER, F., JAVITT, N.B.  
Morphologic changes in hamster liver during intrahepatic cholestasis induced by taurolithocholate.  
*Lab. Invest.* 24, 292-297 (1966)

55. KAKIS, G., YOUSEF, I.M.  
Pathogenesis of lithocholate - and tauroolithocholate induced intrahepatic cholestasis in rats.  
Gastroenterology 75/4, 595-607 (1978)
56. NEMCHAUSKY, B.A., LAYDEN, T.I., BOYER, J.L.  
Effects of chronic choleretic infusions of bile acids on the membrane of the bile canaliculus.  
Lab. Invest. 36/3, 259-267 (1977)
57. COOPER, A.C., LESLIE, M.H., FISHCOFF, S. et al.  
Factors influencing the lipid composition and fluidity of red cell membranes in vitro-production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid.  
Biochemistry 17, 327-331 (1978)
58. JAVITT, N.B., EMERMAN, S.  
Metabolic pathways of bile acid formation in the rat.  
Mt. Sinai J. Med. 37, 477 (1970)
59. BOYER, J.L., LAYDEN, T.J., HRUBAN, Z.  
Mechanisms of cholestasis - Tauroolithocholate alters canalicular membrane composition, structure and permeability.  
In: Membrane Alterations as Basis of Liver Injury, ed. by H. Popper, L. Bianchi, W. Reutter, Proc. of the First Part of the Basel Liver Week (1976)
60. BONVICINI, F., GAUTIER, A., GARDIOL, D., BOREL, G.A.  
Cholesterol in acute cholestasis induced by tauroolithocholic acid. A Cytochemical Study in Transmission and Scanning Election Microscopy.  
Laboratory Investigation 38/4, 487-495 (1978)
61. PALMER, R.H.  
The formation of bile acid sulfates: A New Pathway of Bile Acid Metabolism in Humans.  
Proc. N. A. of S. 58, 1047-1050 (1967)

62. PALMER, R.H.  
Bile acid sulfates. II. Formation, metabolism, and excretion of lithocholic acid sulfates in the rat. *Journal of Lipid Research* 12, 680-687 (1971)
63. LAYDEN, T.J., BOYER, J.L.  
Tauroolithocholate-induced cholestasis: Taurocholate, but not dehydrocholate, reverses cholestasis and bile canalicular membrane injury. *Gastroenterology* 73, 120-128 (1977)
64. HEGNER, D., KROKER, R., ANWER, M.S.  
Der Einfluß von Clanobutin auf die Gallesekretion der isoliert perfundierten Rattenleber. *Drug Res.* 29, 11-15 (1979)
65. FIEBIGER, I.  
Versuche zur Entwicklung eines Cholestasemodells bei der Ratte und dessen Beeinflussung durch Choleretika. *Vet. med. Diss., München* (1980)
66. BERCHTOLD, P.  
Die Wirkung von Clanobutin auf die Gallensekretion bei Ratte und Hund. *Arzneim. Forsch. / Drug Res.* 30 (II), 1878-1884 (1980)
67. LICHTMAN, S.S.  
Diseases of the liver, gallbladder and bile ducts. Vol 1 1953 Lea and Febiger, Philadelphia, Pennsylvania.
68. SCHMIDT, F.W.  
Rationale for the use of enzyme determinations in the diagnosis of liver disease. In: *Evaluation of liver function* pp. 51-77, ed. by M. Demers and M. Shaw, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich (1978)
69. ROBERTS, W.M.  
Variation in the phosphatase activity of the blood in disease. *Brit. J. Exper. Path.* 11, 90 (1930)

70. CORNELIUS, C.E.  
Liver function. Clinical biochemistry of domestic animals,  
ed. by J.J. Kaneko and C.E. Cornelius, 2nd edition Vol 1,  
New York, Acad. Press, 161-230 (1971).
71. KELLER, P.  
Enzymaktivitäten bei kleinen Haus- und Laboratoriumstieren:  
Organanalysen, Plasmaspiegel und intrazelluläre Verteilung.  
Kleintierpraxis 24, 51-68 (1979)
72. GREUNER-SIGUSCH, P.  
Alkalische Phosphatase.  
Ärztl. Lab. 23, 44-48 (1977)
73. WISHER, M.H., EVANS, W.H.  
Enzymes of the hepatocyte plasma membrane. In: Membrane  
Alteration as Basis of Liver Injury, ed. by H. Popper,  
L. Bianchi, W. Reutter, Proceedings of the First Part of  
the Basel Liver Week (1976)
74. COLEMAN, R., HOLDSWORTH, G., VYVODA, O.S.  
Hepatocyte surface enzymes and their appearance in the bile.  
Membrane Alterations as Basis of Liver Injury, ed. by H.  
Popper, L. Bianchi, W. Reutter, Proceedings of the First  
Part of the Basel Liver Week (1976)
75. KRAFT, W., DÜRR, U.M.  
Kompendium der klinischen Laboratoriumsdiagnostik bei Hund,  
Katze und Pferd.  
2. Aufl., Schaper Verlag, Hannover (1982)
76. NAGODE, L.A., KOESTNER, A., STEINMEYER, C.L.  
Organ identifying properties of alkaline phosphatases from  
canine tissues.  
Clin. Chim. Acta. 26, 45-54 (1969)
77. WINKELMAN, J., NADLER, S., DEMETRION, J., PILEGGI, V.J.  
The clinical usefulness of alkaline phosphatase isoenzyme  
determinations.  
Am. J. Clin. Path. 57, 625-634 (1972)

78. EWEN, L.M.  
Separation of alkaline phosphatase isoenzymes and evaluation of the clinical usefulness of this determination.  
Am. J. Clin. Path. 61, 142-154 (1974)
79. ARONSEN, K.F., HAJERSTRAND, I., NORDÉN, J.G.  
Enzyme studies in dogs with extra-hepatic biliary obstruction.  
Scand. Gastroenterol. 3, 355-368 (1968)
80. KAPLAN, M.M., RIGHETTI, A.  
Induction of rat liver alkaline phosphatase: The mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction.  
J. Clin. Invest. 49, 508-516 (1970)
81. KRYSZEWSKI, A.J., NEALE, G., WHITFIELD, J.B., MOSS, D.W.  
Enzyme changes in experimental biliary obstruction.  
Clin. Chim. Acta 47, 175-182 (1973)
82. PALMER, R.H., HRUBAN, Z.  
Production of bile duct hyperplasia and gallstones by lithocholic acid.  
J. Clin. Invest. 45/8, 1255-1267 (1966)
83. LETTOW, E.  
Lebererkrankungen beim Hund (1) u. (3).  
Tierärztliche Praxis 1, 321-343 (1974) u. 3, 67-73 (1975)
84. VAN VLEET, I.F., ALBERTS, I.O.  
Evaluation of liver function tests and liver biopsy in experimental carbon tetrachloride intoxication and extrahepatic bile duct obstruction in the dog.  
Am. J. Vet. Res. 29, No.11, 2119-2131 (1968)
85. DALTON, J.R.F., HILL, F.W.G.  
Intrahepatic cholestasis in a dog: A clinico pathological study.  
Vet. Rec. 97, 383-386 (1975)
86. LITCHFIELD, M.H., CONNING, D.M.  
Drug induced alkaline phosphatase activity in the liver of the beagle dog.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 22, 329 (1972)

87. LITCHFIELD, M.H., CONNING, D.M.  
Effect of phenobarbitone on plasma and hepatic alkaline phosphatase activity in the dog.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 272, 358-362 (1972)
88. LITCHFIELD, M.H., GARTLAND, C.J.  
Plasma enzyme activity and hepatocellular changes in the Beagle dog after single or repeated administration of carbon tetrachloride.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 30, 117-128 (1974)
89. HOE, C.M., O'SHEA, J.D.  
The correlation of biochemistry and histopathology in liver disease in the dog.  
Vet. Rec. 77, 1164-1171 (1965)
90. HOE, C.M., JABARA, A.G.  
The use of serum enzymes as diagnostic aids in the dog.  
J. Comp. Path. 77, 245-254 (1967)
91. FREUDIGER, U.  
Enzymdiagnostik der Pankreaserkrankungen.  
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 85, 61-67 (1972)
92. ROGERS, W.A.  
Source of serum alkaline phosphatase in clinically normal and diseased dogs: A clinical study.  
JAVMA 168/10, 934-937 (1976)
93. HANES, C.S., HIRD, F.J.R., ISHERWOOD, F.A.  
Synthesis of peptides in enzymatic reactions involving Glutathione.  
Nature 166, 288-292 (1950)
94. FODOR, P.J., MILLER, A., NEIDLE, A., WAELSCH, H.  
Enzymatic synthesis of Glutathione by a transfer-reaction.  
J. Biol. Chem. 203, 991-1001 (1953)

95. GOLDBERG, D.M., MARTIN, J.V.  
Role of  $\gamma$ -Glutamyl-transpeptidase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease.  
Digestion 12, 232-246 (1975)
96. NOONAN, N.E., MEYER, D.J.  
Use of plasma arginase and  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase as specific indicators of hepatocellular or hepatobiliary disease in the dog.  
Am. J. Vet. Res. 40/7, 942-947 (1979)
97. SZEWCZUK, A.  
A soluble form of Gamma-Glutamyl-transpeptidase in human tissues.  
Clin. Chim. Acta 14, 608-614 (1966)
98. ORLOWSKI, M.  
Possible role of Glutathione in transport processes.  
Adv. Exp. Biol. 69 (90), 13-28 (1976)
99. ZINSER, W.  
Gamma-Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT).  
Ärztl. Lab. 23, 31-36 (1977)
100. SHAW, L.M.  
Molecular properties of  $\gamma$ -Glutamyltransferase.  
In: Evaluation of Liver Function, ed. by L.M. Demers and L.M. Shaw, Urban & Schwarzenberg, Baltimore, Munich (1978)
101. LUM, G., GAMBINO, S.R.  
Serum, Gamma-Glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone.  
Clinical Chemistry 18/4, 358-362 (1972)
102. MEISTER, A.  
On the enzymology of amino acid transport.  
Science 180, 33-38 (1973)

103. MEISTER, A.  
The  $\gamma$ -glutamyl cycle: diseases associated with specific enzyme deficiencies.  
Ann. intern. Med. 81, 247-253 (1974)
104. KOKOT, F., KUSKA, J., MRASZEK, J.  
Die Bedeutung der Gamma-Glutamyltranspeptidase in der klinischen Diagnostik.  
Z. Ges. Inn. Med. 18, 851-856 (1963)
105. COLOMBO, F., PEHEIM, E., BACHMAN, C.  
 $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the rat liver after portocaval shunt.  
Ped. Res. 10, 18-24 (1976)
106. LANDON, M.  
 $\gamma$ -Glutamyl transferase in breast milk.  
Ann. clin. Biochem. 12, 48-50 (1975)
107. MÜLLER, E., COLOMBO, J.P., PEHEIM, E., BIRCHER, J.  
Histochemical demonstration of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in rat liver after portocaval anastomosis.  
Experientia 30, 1128-1129 (1974)
108. JOLLOW, D.J., THORGEIRSSON, S.S., POTTER, W.Z., HASHIMOTO, M., MITCHELL, J.R.  
Acetaminophen - induced hepatic necrosis. VI. Metabolic disposition of toxic and non-toxic doses of acetaminophan. Pharmacology 12, 251-271 (1974)
109. AMEER, B., GREENBLATT, D.J.  
Acetaminophen.  
Ann. Int. Med. 87, 202-209 (1977)
110. PATEL, S., O'GORMAN, P.  
Demonstration of serum  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase isoenzymes using cellogel electrophoresis.  
Clin. Chim. Acta 35, 239-240 (1971)

111. KOKOT, F., KUSKA, J.  
Über die Bedeutung der Isoenzyme der  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase in der klinischen Diagnostik.  
Clin. Chim. Acta 11, 118-121 (1965)
112. ORLOWSKI, M.  
Heterogeneity of serum  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase in hepatobiliary disease.  
Clin. Chim. Acta 15, 387-391 (1967)
113. MIYAZAKI, S., OKUMURA, M.  
Change of serum  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase level and isoenzyme pattern in hepatobiliary pancreatic disease.  
Clin. Chim. Acta 40, 193-197 (1972)
114. DRAGOSICS, B., FERENCI, P., PESENDORFER, F., WEWALKA, F.G.  
Gamma-Glutamyltranspeptidase (GGPT): Its relationship to other enzymes for diagnosis of liver disease.  
Progress in Liver Disease 5 (26), 436-449 (1976)
115. SZCZEKLIK, E., ORLOWSKI, M., SZEWCZUK, A.  
Serum  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase activity in liver disease.  
Gastroenterology 41, 353-359 (1961)
116. SZASZ, G.  
Klinisch-chemische Verlaufskontrolle chronischer Lebererkrankungen.  
Diagnostik 5, 62-65 (1972)
117. IDÉO, G., MORGANTI, A., DIOGUARDI, N.  
 $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase: A clinical and experimental study.  
Digestion 5, 326-336 (1972)
118. BRUNNER, H., SCHILLER, G.  
Zur Bedeutung der Gamma-Glutamyl-Transpeptidase für die Diagnostik von Lebererkrankungen.  
Fortschr. Med. 95 (5), 287-290 (1977)
119. EISENBERG, K., ORTMANS, H.  
Gamma-Glutamyl-Transpeptidase-Aktivität bei Lebererkrankungen.  
Med. Klin. 68, 798-804 (1973)

120. LUKASIK, S., RICHTERICH, R., COLOMBO, J.P.  
Der diagnostische Wert der alkalischen Phosphatase der  
Leucinamino peptidase und der  $\gamma$ -Glutamyl-Trenspeptidase  
bei Erkrankungen der Gallenwege.  
Schweiz. Med. Wschr., 3. Bd., 98, 81-83 (1968)
121. SCHMIDT, E., SCHMIDT, F.W.  
Kleine Enzym-Fibel. Schriftenreihe Diagnostica Boehringer  
Mannheim, 2. Aufl., Boehringer Mannheim GmbH (1976)
122. JACOBS, W.L.W.  
Gamma-Glutamyl-transpeptidase in diseases of liver, car-  
diovascular system and diabetes mellitus.  
Clin. Chim. Acta 38, 419-434 (1972)
123. FERENCI, P., BURGER, E., DRAGOSICS, B., FILL, W.-D.,  
PESENDORFER, F., WELWALKA, F.  
Relation der Gamma-GT zu anderen Enzymen und zur Leberhi-  
stologie bei akuten und chronischen Lebererkrankungen.  
Dubrovnik, Proc. Clin. Chem. meeting (1-74)
124. KREBS, C.  
Die Gamma-Glutamyl-Transferase-Aktivität bei der Katze.  
Vet. med. Diss., München (1979)
125. IKEDA, S., YAMAOKA, S., WATANABE, H., KAMYA, T.  
Some serum enzyme activities of horses.  
Exp. Rep. Equine Hlth. Lab. No. 12, 22-29 (1975)
126. CORNELIUS, C.E.  
The diagnosis of liver disease in the dog and horse.  
The Iowa State College Veterinarian XX/3, 155-162 (1958)
127. KAMMERMANN-LÜSCHER, B.  
Zur Behandlung von Lebererkrankungen beim Kleintier.  
Schweiz. Arch. Tierheilk. 114, 561-572 (1972)
128. JAKSCH, W.  
Diagnose und Therapie von Leberkrankheiten bei Kleintieren.  
Wien. tierärztl. Mschr. 61/5, 127-138 (1974)

129. ZEIN, M., DISCOMBE, M.G.  
Serum-Gamma-Glutamyl-transpeptidase as a diagnostic aid.  
Lancet 2, 748-750 (1970)
130. BETRO, M.G., DON, R.C.S., EDWARDS, J.B.  
Gamma-Glutamyl transpeptidase in diseases of the liver  
and bone.  
Am. J. Clin. Path. 60, 672-678 (1973)
131. KAMPA, J.S., JARZABEK, J., CLAIN, J.  
The use of Gamma-Glutamyl transpeptidase in differentia-  
ting liver from bone isoenzymes of alkaline phosphatase.  
Clin. Biochem. 9 (5), 234-236 (1977)
132. KÖLLMER, H.P.  
Die Glutamat-Dehydrogenase NAD(PO) (GLDH) und ihr Verhält-  
nis zur Aspartat-Transaminase (GOT) und Alanin-Transamina-  
se (GPT) im Serum klinisch gesunder Hunde.  
Vet. med. Diss., Universität Berlin (1968)
133. BERGEMEYER, H.U.  
Methoden der enzymatischen Analyse.  
Bd. I, 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim (1974)
134. BÄSSLER, K.H., HAMMER, Ch.  
Reduktive Aminierung von Ketoaldehydsäuren an Glutamin-  
säuredehydrogenase.  
Biochem. Zschr. 330, 446-450 (1958)
135. BÄSSLER, K.H.  
Glutaminsäuredehydrogenase. In: Hoppe-Seyler/Thierfelder,  
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen  
Analyse, Enzyme Teil A.  
Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York,  
10. Aufl. (1964)
136. HOGEBOOM, G.H., SCHNEIDER, W.C.  
Intracellular distribution of enzymes.  
XI. Glutamic dehydrogenase.  
J. biol. Chem. 204, 233-238 (1953)

137. SCHMIDT, E.  
Strategy and evaluation of enzyme determinations in serum  
in diseases of the liver and the biliary system.  
In: Evaluation of Liver Function, pp. 79-101, ed. by M.  
Demers and L.M. Shaw, Urban u.Schwarzenberg, Baltimore,  
Munich (1978)
138. RAPOPORT, S.  
Medizinische Biochemie.  
VEB Verlag Volk und Gesundheit, 3.Aufl., Berlin (1965)
139. HELM, v.d.  
L-Glutamate isoenzymes.  
Nature 194, 773-778 (1962)
140. SCHMIDT, E., SCHMIDT, F.W., WILDHIRT, E.  
Vergleichende Aktivitätsbestimmungen von Enzymen des ener-  
gieliefernden Stoffwechsels in der menschlichen und in  
der Rattenleber. Fermentaktivitätsbestimmungen in der  
menschlichen Leber. I. Mitt.  
Klin. Wschr. 36, 172-185 (1958)
141. SCHMIDT, E., SCHMIDT, F.W.  
Enzymbestimmungen zur Diagnose und Verlaufsbeobachtung  
von Lebererkrankungen.  
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 70, 612-621 (1964)
142. FEVERY, J., BLANCKAERT, N., HEIRWEGH, K.P.M., GROOK, J.de  
Bilirubin conjugates: Formation and detection.  
Progress in Liver Disease 5 (12), 183-214 (1976)
143. TENHUNEN, R.  
The enzymatic degradation of heme.  
Semin. Hematol. 9, 19-29 (1972)
144. GRAY, C.H., NICHOLSON, C.S., TIPTON, G.  
Degradation of haem compounds to bile pigments.  
Nature (New Biol.) 239, 5-8 (1972)

145. BRODERSEN, R., THEILGAARD, J.  
Bilirubin colloid formation in neutral aqueous solution.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 24, 395-398 (1969)
146. JAKOBSEN, J.  
Binding of Bilirubin to human serum albumin-determination  
of the dissociation constants.  
FEBS Lett 5, 112-114 (1969)
147. BRATLID, D.  
Reserve albumin binding capacity, salicylate saturation  
index, and red cell binding of bilirubin in neonatal jaundice.  
Arch. Dis. Child 48, 393-397 (1973)
148. BROWN, W.R., GRODSKY, G.M., CARBONE, G.V.  
Intracellular distribution of tritiated bilirubin during  
hepatic uptake and excretion.  
Am. J. Physiol. 207, 1237-1241 (1964)
149. BERNSTEIN, L.H., BEN EZZER, J., GARTNER, L., ARIAS, I.M.  
Hepatic intracellular distribution of tritium labelled un-  
conjugated and conjugated bilirubin in normal and Gunn rats.  
J. Clin. Invest. 45, 1194-1201 (1966)
150. MEUWISSEN, J., HEIRWEGH, K., DE GROOTE, J.  
Intracellular bilirubin binding to proteins, ed. by  
H. Veda: Proceedings of the Third World Congress of Gas-  
troenterology, Tokyo, Naukado Vol.4, 85-86 (1967)
151. ARIAS, I.J.  
Transfer of bilirubin from blood to bile.  
Semin. hematol. 9, 55-70 (1972)
152. LITWACK, G., KETTERER, B., ARIAS, I.M.  
Ligandin: A hepatic protein which binds steroids, bilirubin,  
carcinogens and a number of exogenous organic anions.  
Nature 234 (466-467 (1971)
153. JAVITT, N.B.  
Bile salt regulation of hepatic excretory function.  
Gastroenterol. 56/3, 622-625 (1969)

154. GORESKEY, C.A., HADDAD, H.H., KLUGER, W.S., NADEAN, B.E.,  
BACH, G.G.  
The enhancement of maximal bilirubin excretion with tau-  
rocholate-induced increments in bile flow.  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 52, 389-403 (1974)
155. ELDER, G., GRAY, C.H., NICHOLSON, D.C.  
Bile pigment fate in gastrointestinal tract.  
Semin. Hematol. 9, 71-89 (1972)
156. BILLING, B.H., RAIA, S., ARMES-MERINO, R.  
The origin of unconjugated bilirubin in the liver in ob-  
structive jaundice.  
Beck, K. (ed.): Ikterus. Stuttgart F.K. Schattauer, 49-52  
(1968)
157. EIKMEIER, H.  
Diagnostische Untersuchungen über die Lebererkrankungen  
des Hundes.  
Zentralbl. f. Vet. Med. 7, 22-58 (1959)
158. HOE, C.M., HARVEY, D.G.  
An investigation into liver function tests in dogs.  
Part II. Tests other than transaminase estimations.  
G. small anim. Pract. Vol. 2, 109-122 (1961)
159. FREITAG, A.  
Dissertation am Fachbereich Tiermedizin der Ludwig-  
Maximilians-Universität München, in Vorbereitung (1982)
160. KNOLL, L.  
Dissertation am Fachbereich Tiermedizin der Ludwig-  
Maximilians-Universität München, in Vorbereitung (1982)

Herrn Prof. Dr. W. Kraft danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Hegner für die freundlichen Ratschläge und wertvollen Anregungen.

Den Kollegen A. Freitag und L. Knoll sei für die Hilfe bei der Probengewinnung gedankt.



## Lebenslauf

Name: Hubert Winzinger

geb. am: 22.10.1952 in München

Eltern: Maximilian Winzinger und Elisabeth Winzinger, geb. Stadler

Schulausbildung: 1959-1964 Besuch der Volksschule  
1964-1973 Erasmus-Grasser-Gymnasium München  
Juli 1973 Abitur

Studium: WS 1973/74 bis SS 1974  
Studium der Forstwissenschaft an der Forstwissenschaftlichen Fakultät der Universität München  
  
ab WS 1974/75  
Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
  
Tierärztliche Prüfung: 12.12.1979  
Approbation: 11. 2.1980

Beruflicher Werdegang: seit 21.10.1980 wissenschaftl. Hilfskraft an der I. Medizinischen Tierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München









